

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



**Bc. Šárka Ramešová**

**ELEKTROCHEMICKÉ STUDIUM ROZKLADU PŘÍRODNÍCH BARVIV  
POUŽÍVANÝCH NA UMĚLECKÝCH PAMÁTKÁCH**

The electrochemical study of the degradation of the natural dyes  
from historical objects

Diplomová práce

Školitelka / vedoucí práce:

RNDr. Karolina Pecková Ph.D. / Mgr. Romana Sokolová, Dr.

Praha, 2011

**Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne.....

.....

Šárka Ramešová

Tato diplomová práce byla vypracována na katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze a na Ústavu fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR v letech 2010 – 2011. Práce byla finančně podporována projektem GAČR 203/09/1607 a MŠMT ČR (projekt MSM0021620857) a projektem SVV 2011-263204

Úvodem bych chtěla poděkovat svým školitelkám Mgr. Romaně Sokolové, Dr. a RNDr. Karolině Peckové Ph.D. za profesionální vedení, cenné rady, připomínky a veškerou pomoc při vypracování diplomové práce.

Současně bych ráda poděkovala i Mgr. Jánovi Žabkovi, CSc. za umožnění provedení analýz LC-MS/MS.

## Abstrakt

V této práci byla studována oxidace quercetinu (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavon) a luteolinu (3',4',5,7-tetrahydroxyflavon). Tyto intenzivně barevné polyfenolické látky patří do skupiny přirozeně vyskytujících se sloučenin flavonoidů. Studie se týká analýzy produktů rozkladu původních barev. Produkty rozkladu vzniklé během procesu stárnutí mohou být použity jako otisk prstu k určení původní barvy.

Degradační procesy flavonoidů byly studovány pomocí elektrochemických metod a UV/Vis spektroskopie ve vodném prostředí. Oxidační mechanismus zahrnuje přenos elektronů spojený s chemickou reakcí a je ovlivněn acidobazickými vlastnostmi quercetinu. Disproporcionační konstanty  $pK_1$  a  $pK_2$  pro quercetin a  $pK_1$  a  $pK_2$  pro luteolin byly zjištěny kombinací dvou nezávislých metod: acidobazickou titrací a UV/Vis spektroskopií. Stabilita obou látek významně závisí na přítomnosti kyslíku. Distribuce oxidačních produktů quercetinu ve vodném prostředí v rámci působení kyslíku byla sledována pomocí LC-MS/MS a LC-DAD analýzy.

## Abstract

The oxidation of quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone) and luteolin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone) has been studied. These intensively coloured polyphenolic compounds belong to a large group of naturally occurring flavonoid compounds. They were used with advantage as colourants in old tapestries. The study concerns the analysis of degradation processes of the original dyes. Degradation products formed during the ageing process can be used as fingerprints for the determination of the original colours.

The degradation processes of flavonoid compounds were studied by electrochemical methods, absorption spectrometry and separation methods in aqueous media. The oxidation mechanism involves electron transfer coupled with chemical reaction and is influenced by the acidobasic properties of quercetin.

The dissociation constants  $pK_1$  and  $pK_2$  of quercetin and  $pK_1$  and  $pK_2$  of luteolin were determined by combining of independent methods: acid-base titration and UV-Vis spectroscopy. The stability of both compounds significantly depends on the presence of the oxygen. The distribution of the oxidation products of quercetin in aqueous media within the exposure to oxygen was monitored by LC-MS/MS and LC-DAD analysis.

Předmětová hesla: analytická chemie,  
elektrochemie.

Klíčová slova: flavonoidy,  
oxidační produkty,  
antioxidanty,  
stabilita,  
disociační konstanta.

# Obsah

<b>Prohlášení</b> .....	2
Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Obsah .....	7
Seznam používaných zkratk a symbolů .....	9
1. Teoretická část .....	11
1.1 Cíl práce.....	11
1.2 Flavonoidy .....	12
1.2.1 Quercetin.....	13
1.2.2 Luteolin a apigenin .....	14
1.3 Fyzikální a chemické vlastnosti flavonoidů.....	15
1.4 Analytické metody stanovení flavonoidů .....	15
1.5 Elektrochemické vlastnosti a metody stanovení .....	16
2. Experimentální část.....	17
2.1 Použité reagencie .....	17
2.2 Použité přístroje .....	18
2.3 Pracovní postupy.....	19
2.3.1 Voltametrie a coulometrie.....	19
2.3.2 Titrací měření.....	19
2.3.3 Chromatografická měření .....	20
2.3.4 Spektrofotometrické měření.....	21
3. Výsledky a diskuze .....	22
3.1 Elektrochemické chování.....	22
3.1.1 Cyklická voltametrie quercetinu, luteolinu a apigeninu .....	22
3.1.2 pH závislost.....	24
3.2 Stanovení disociační konstanty.....	28
3.2.1 Stanovení disociační konstanty spektrofotometricky .....	29
3.2.2 Stanovení disociační konstanty titračně.....	32
3.3 Reakční produkty .....	34
3.4 Mechanismus oxidace.....	38
3.5 Vliv přítomnosti kyslíku .....	40
3.5.1 Quercetin.....	40

3.5.2 Luteolin .....	43
3.5.3 LC-MS/MS .....	45
4. Závěr .....	47
5. Literatura.....	48
6. Příloha A.....	53



## Seznam používaných zkratek a symbolů

$A$	Absorbance
$A$	Chinoidní derivát
$A^{2-}$	Dianion
$AH^-$	Anion
$AH_2$	Nedisociovaná molekula studované látky
BR pufr	Brittonův – Robinsonův pufr
$c$	Molární koncentrace ( $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ )
CZE	Kapilární zónová elektroforéza
DAD	Detektor s diodovým polem
$e^-$	Elektron
$E$	Potenciál (V)
$E_p$	Potenciál píku (V)
ESI	Ionizace elektrosprejem
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
$H^+$	Proton
HPLC-DAD	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detektorem s diodovým polem
$i$	Elektrický proud ( $\mu\text{A}$ )
$k$	Rychlostní konstanta ( $\text{s}^{-1}$ )
LC-MS	Kapalinová chromatografie s hmotnostním detektorem
MS	Hmotnostní spektroskopie
$m/z$	Poměr hmotnosti ku náboji
NMR	Nukleární magnetická rezonance
P1	2-(3',4'-dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3(2H)-on
P2	2-(3,4-dihydroxyphenyl) -2-oxooctová kyselina
P3	2,4,6-trihydroxybenzoová kyselina
P4	3,4-dihydroxybenzoová kyselina
pH	Záporný dekadický logaritmus koncentrace oxoniových iontů
PIGE	Parafilmem impregnovaná grafitová elektroda
pK	Záporný dekadický logaritmus disociační konstanty

RP-HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzní fází (obrácenou fází)
$t$	Čas (s)
$t_R$	Retenční čas (min)
TLC	Tenkovrstevná chromatografie
UV/Vis	Ultrafialová a viditelná (spektroskopie)
$\nu$	Rychlost polarizace ( $V \cdot s^{-1}$ )
$[X]$	Okamžitá koncentrace látky X ( $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ )
$[X]_0$	Koncentrace látky X v čase $t = 0$ ( $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ )
$\lambda$	Vlnová délka (nm)
*	Kolona

# 1. Teoretická část

## 1.1 Cíl práce

Předkládaná diplomová práce byla vypracována v rámci projektu, který je řešen na Ústavu fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR. Tento projekt se věnuje elektrochemické studii rozkladu přírodních barviv používaných na uměleckých památkách. Analýza barviv používaných na uměleckých památkách může být cenným nástrojem k určení, jak objekt vypadal, popřípadě jak je starý a odkud původně pochází. Toto poznání také umožňuje zvolit vhodné postupy při restaurování.

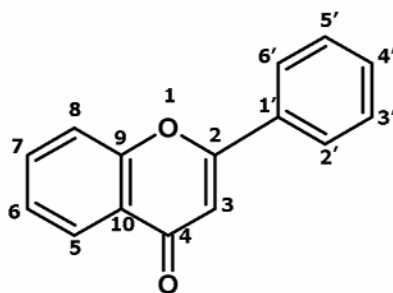
Předmětem této práce je studium oxidace flavonoidů, které se používaly již od počátku 16. století jako přírodní barviva pro barvení tapisérií a dalších uměleckých děl. Identifikace barev na starých textiliích je zvlášť náročná práce a to díky složitosti procesů degradace [1], kterými prošly organické molekuly citlivé na světlo. Zjištění degradačních produktů a změny ve struktuře matrice by mohly pomoci při výběru muzejních podmínek jako jsou například intenzita osvětlení, UV záření, vlhkost prostředí, a tím i snížit riziko rozkladu historického materiálu [2]. Flavonoidy jsou hlavními chromofory ve většině běžně používaných žlutých barviv, hlavním zástupcem je quercetin, dále pak luteolin a apigenin. Tyto látky se hojně vyskytují v bylinách (smetanka lékařská, srpice barvířská) a stromech, původně pocházejících ze Severní Ameriky [2].

Cílem této práce je studium oxidace quercetinu pomocí elektrochemických metod ve vodném prostředí, identifikovat oxidační produkty po elektrolýze pomocí analytických metod HPLC-DAD a LC-MS a stanovit disociační konstanty quercetinu a luteolinu. Oxidační vlastnosti luteolinu a apigeninu jsou sledovány z důvodů jejich vzájemného porovnání.

## 1.2 Flavonoidy

Flavonoidy, jinak nazývané bioflavonoidy či vitamíny P, jsou početně bohatou a pestrou skupinou fenolických sloučenin výhradně rostlinného původu, v jejichž struktuře je základním skeletem 2-fenyl-1,4-benzopyron (obr. 1) [3]. Flavonoidy jsou odvozené od kyslíkaté heterosloučeniny flavonu, tvořeného dvěma benzenovými kruhy spojenými heterocyklickým pyranem. Běžně bývají všechny tři kruhy substituovány hydroxy skupinami nebo methoxy skupinami a jednotlivé deriváty se liší pouze stupněm substituce nebo oxidace.

V současné době je známo více než 4000 flavonoidů [4] a stále se nacházejí další. Rozeznáváme následující základní struktury flavonoidů: katechiny, leukoanthokyanidiny, flavanony, flavony, flavonoly, isoflavony a anthokyanidiny [5,6]



**Obr. 1:** Strukturní vzorec 2-fenyl-1,4-benzopyronu.

Flavonoidy patří mezi nejdůležitější rostlinné pigmenty pro zbarvení květin od žluté přes oranžovou do červené. Jsou také odpovědné za podzimní barvy a jsou důležité pro normální růst, rozvoj a ochranu rostlin. Mnoho flavonoidů přispívá také k chuti a barvě potravin [6].

Historická přírodní barviva byla získávána z rostlinných a živočišných zdrojů a používala se po rozmanité úpravě u barvení textilií a uměleckých předmětů. Barviva z přírodních zdrojů se používala k barvení tapisérií již v 15. a 16. století.

Některé flavonoidy fungují jako účinné antioxidanty a jsou schopny zachytávat reaktivní radikály. Mezi nejúčinnější patří flavonoidy ostružin, malin, malinoostružin, lékořice, černého rybízu, granátového jablka, červených grapefruitů, oliv, olivového oleje, kakaa, borůvek a rajčat. Velké množství flavonoidů se nalézá též v plodech ostropestřece mariánského nebo aronie, tzv. černého jeřábu [7,8,9]. Nápoje jako červené víno, čaj, káva a pivo obsahují velké množství flavonoidů. Člověk spotřebuje průměrně asi 1g flavonoidů za

den [10]. Flavonoidy jsou také v léčivých rostlinách a bylinách, které se hojně využívaly v lidové medicíně [4].

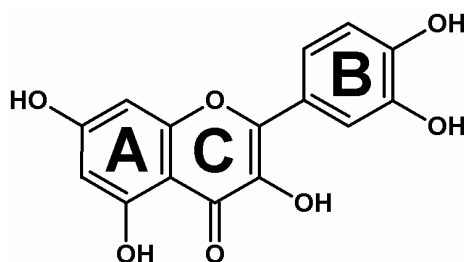
Tyto látky vykazují antimikrobiální a antivirovou aktivitu, jsou známy jejich protizánětlivé a dokonce i protinádorové účinky [11,12]. Flavonoidy mají v potravinách důležitou nutriční, ale i farmaceutickou funkci. Z důvodů jejich specifického výskytu v různých druzích rostlin mohou být vhodnými ukazateli kvality a bezpečnosti potravin [13].

Antioxidační schopnost některých flavonoidů ochraňuje krevní lipidy před oxidací a zabráňuje tak vzniku arteriosklerózy a trombotických onemocnění [14]. Je prokázáno, že dostatečný příjem flavonoidů a ostatních polyfenolů vyváženou stravou je spojen s nižším výskytem onemocnění srdce a cév [15]. Flavonoidy mohou také pomoci při léčbě nádorových onemocnění a brání invazi nádorových buněk [4]. Účastníkům studie, kteří jedli více potravin obsahujících flavonoidy, se snížilo riziko vzniku rakoviny plic. Oproti tomu, vysoký obsah flavonoidů ve stravě nastávajících matek zvyšuje riziko, zejména akutní myeloidní leukémie u novorozenců [4].

Přírodní flavonoidy se nejčastěji vyskytují ve formě O-glykosidů, obsahují tedy ve své molekule necukernou součást (aglykon, umístěn na pozici 3 nebo 7) a cukernou složku (nasubstituovanou na hydroxylovou skupinu). Volné aglykony se vyskytují pouze zřídka [7].

### 1.2.1 Quercetin

Quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavon, obr. 2), je jeden z nejhojněji se vyskytujících flavonoidů přítomných v ovoci a zelenině. V rostlinách se vyskytuje hlavně v listech, ale i v jiných částech rostlin, jako aglykon a glykosid [5]. V přírodě bylo nalezeno téměř 180 druhů glykosidů quercetinu [5] a to například ve slupkách jablek a hrušek, v cibuli, hrášku, špenátu, kapustě, kvěťáku, okurce, meruňce, švestce, jahodách a různých bobulích [5,8,16,17].



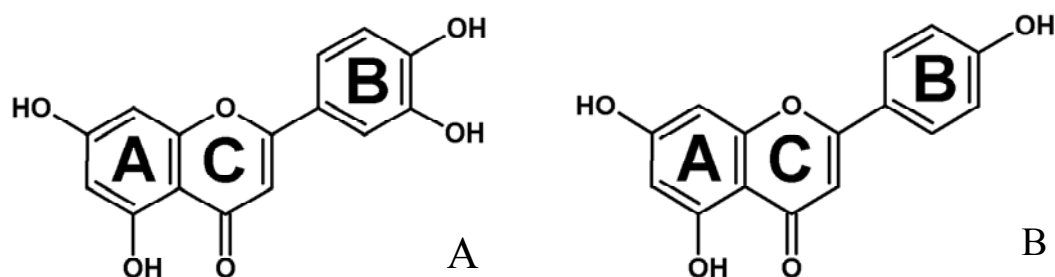
**Obr 2:** Chemická struktura quercetinu.

Farmakologický význam této látky spočívá v inhibici některých enzymů. Díky své chemické struktuře vykazuje mimořádné antioxidační schopnosti a je účinnějším antioxidantem než vitamín C a E [18]. Quercetin má také antihepatotoxický účinek [4].

Bylo zjištěno, že quercetin přispívá k enzymatickému i neenzymatickému hnědnutí potravy [19,20].

### 1.2.2 Luteolin a apigenin

Nejhojnějšími flavony v rostlinách jsou luteolin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavon, obr. 3A) a apigenin (3',5,7-trihydroxyflavon, obr. 3B).



**Obr. 3:** A) Chemická struktura luteolinu, B) chemická struktura apigeninu.

Obě látky se přirozeně vyskytují také v různých druzích ovoce, zeleniny a čaji [21]. Velké množství luteolinu je obsaženo v nati rýtu barvířského a v květech a listech kručinky barvířské. S výhodou se z nich získává žluté barvivo, které se používá k barvení látek, plátna a vlny [2].

Apigenin má mnoho biologických a farmaceutických účinků, které využívají jeho antioxidační [22,23], protinádorové [24] a protizánětlivé vlastnosti [25]. Apigenin je obvykle extrahován z přírodních zdrojů, například z celerové natě, červené papriky, petržele, celeru a heřmánku [8,26].

Tato látka se hojně využívá v potravinářství, ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu [21].

### 1.3 Fyzikální a chemické vlastnosti flavonoidů

Studované látky jsou za laboratorní teploty světle žluté, pevné sloučeniny. Dobře se rozpouští v methanolu, ethanolu, acetonu, acetonitrilu a hydroxidu sodném a draselném. Rozpustnost ve vodě a v pufrch je omezená, např. ve vodném roztoku Brittonova - Robinsonova pufru o pH = 6,0 byla dosažena maximální koncentrace  $3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  po sonifikaci a při pH = 3 se látka nerozpouští. Studované látky jsou v pevném stavu stabilní, avšak v roztoku podléhají oxidaci vzdušným kyslíkem [27,28]. Bod tání quercetinu, luteolinu a apigeninu se pohybuje v rozmezí od 300 do 330 °C [29].

Studované látky v roztoku podléhají disociaci do několika stupňů v závislosti na počtu hydroxylových skupin v molekule (obr. 2, obr. 3). Znalost disociačních konstant je nutná pro specifikaci jejich redoxních vlastností, nicméně jejich správné určení je spojeno s problémem nedostatečné stability zásobních roztoků v přítomnosti vzdušného kyslíku [30,31,32,33,34]. V literatuře je mnoho rozdílných hodnot disociačních konstant  $pK_a$  pro quercetin: 5,7 [35], 6,74 [36], 7,03 [37], 7,36 [38], 7,7 [39], 8,21 [40], 9,0 [41]. Tato skutečnost je dána pravděpodobně nestabilitou těchto látek v roztoku ve vodném prostředí v přítomnosti vzdušného kyslíku.

### 1.4 Analytické metody stanovení flavonoidů

Flavonoidy jsou hojně zastoupené v ovoci, zelenině a nápojích. Z přírodních vzorků lze analyt získat izolací z matrice, následnou separací a identifikací [5]. Analytické stanovení flavonoidů se v současné době provádí především chromatografickými metodami. Nejčastěji používanou metodou pro analýzu organických barviv je vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC) [42], se spektrofotometrickým UV/Vis detektorem [27,43,44,45], s hmotnostním detektorem (MS) [20,45,46,47,48] nebo nukleární magnetickou rezonancí (NMR spektroskopie) [27,45,46]. Mezi další metody stanovení patří tenkovrstevná chromatografie (TLC) [8,42,46], kapilární zónová elektroforéza (CZE) [5,7] a kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (LC-MS) [2,27,48].

## 1.5 Elektrochemické vlastnosti a metody stanovení

Studované látky jsou snadno elektrochemicky oxidovatelné, a proto mohou být voltametricky stanovovány na vhodné pevné či pastové elektrodě. Oxidační reakce je přes kaskádu mechanismů, které z počátku vedou k oxidaci hydroxylové skupiny na kruhu B, následovaná oxidací zbývajících hydroxylových skupin na kruzích C a A [49].

Oxidační mechanismus polyfenolů a stabilita jejich oxidačních produktů závisí na pH prostředí [50,51,52,53]. Elektrochemická oxidace flavonoidů je poměrně často studována [12,54,55,56,57,58]. Oxidační degradace zahrnuje přítomnost dalších chemických reakcí jako je hydroxylace nebo dimerizace [59].

Makris a kol. [54] vystavil quercetin volné hydroxylové oxidaci, za pomoci katalyzátoru  $\text{CuSO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ . Objevili, ale neidentifikovali dva hlavní oxidační produkty. Navrhli hypotetickou oxidaci vedoucí přes tvorbu nestabilního  $\text{Cu}(2+)$ -chelátu k reakčním nízkomolekulárním produktům, jako je 3,4-dihydroxybenzoová kyselina a kyselina gallová. Jungbluth a kol. [56] studovali oxidace flavonoidů  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  ve směsi acetonitrilu s kyselinou sírovou (30/70, v/v). Zhou a kol. [48] publikovali 18 možných oxidačních produktů quercetinu pomocí GC-MS, LC-MS analýzy včetně 3,4-dihydroxybenzoové kyseliny a gallové kyseliny.

Naše nedávné výsledky ukazují, že v nevodném prostředí v inertní atmosféře argonu se tvoří pouze jeden konečný oxidační produkt [58]. Tato práce se zabývá oxidací quercetinu ve vodném prostředí, stabilitou zkoumaných flavonoidů v přítomnosti vzdušného kyslíku a distribucí produktů rozkladu quercetinu a luteolinu ve vodném prostředí za přítomnosti kyslíku. Disociační konstanta quercetinu a luteolinu je měřena za nepřítomnosti kyslíku.



## 2. Experimentální část

### 2.1 Použité reagenty

Studované látky: (98%) quercetin, (98%) luteolin a (95%) apigenin (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika). Zásobní roztoky látek nebyly připravovány a uchovávány, protože jsou to nestálé látky a na každou analýzu se připravovaly nové roztoky.

Pro přípravu základních elektrolytů byly použity chemikálie: chlorid draselný (Lachema, Brno, Česká republika), hydroxid draselný (Lachema, Brno, Česká republika), ethanol (AppliChem, Darmstadt, Německo), methanol pro spektroskopii (Merck, Praha, Česká republika), acetonitril (Merck, Praha, Česká republika), trifluoroctová kyselina (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika) – vše čistoty p.a. Kyslík byl z používaných roztoků odstraněn proudem argonu (Messer Technogas, Praha, Česká republika). K chromatografickému měření byl použit dusík (Messer Technogas, Praha, Česká republika). Další použité chemikálie byly bromthymolová modř (Lachema, Brno, Česká republika) a fenolftalein (Lachema, Brno, Česká republika).

Brittonovy – Robinsonovy (BR) tlumivé roztoky [60] o příslušném pH byly připraveny smísením  $0,2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  hydroxydu sodného (Lachema, Brno, Česká republika) s roztokem obsahujícím kyselinu boritou (min 99,5%, Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika), fosforečnou (Lachema, Brno, Česká republika) a octovou (Lachema, Brno, Česká republika), každou o koncentraci  $0,04 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Všechny chemikálie byly použity bez dalšího čištění.

Přesná hodnota pH byla měřena digitálním pH-metrem pH 340 s kombinovanou skleněnou elektrodou (Radiometer, Bronshøj, Dánsko). Kalibrace pH-metru byla prováděna standardními vodnými pufrů za laboratorní teploty.

Pro přípravu všech roztoků byla používána deionizovaná voda ze systému Mili Q (Milipore, Praha, Česká republika). Použité roztoky byly uchovány ve skleněných nádobách.

## 2.2 Použité přístroje

Elektrochemické techniky byly kombinovány se separačními technikami a absorpční spektroskopií.

Pro elektrochemická měření byl použit rychlý potenciostat s elektrochemickou celou v tříelektrodovém zapojení. Spojení s počítačem bylo realizováno pomocí IEEE-interface karty PcLab Model 748 (AdvenTech Co., Kalifornie, USA). Jako pracovní elektroda byla použita elektroda ze skelného uhlíku (o průměru 0,7 mm). Referentní argentchloridová elektroda  $\text{Ag}|\text{AgCl}|1\text{M LiCl}$  byla oddělena od roztoku elektrolytu solným můstkem. Jako pomocná elektroda byla použita platinová síťka. Elektrolýza a coulometrie při konstantním potenciálu byla prováděna na potenciostatu Autolab PgStat 30 (Ecochemie, Utrecht, Holandsko) s elektrochemickou celou v tříelektrodovém zapojení. Jako pracovní elektroda byla použita uhlíková pastová elektroda (PIGE – parafilemem impregnovaná grafitová elektroda). Roztok byl míchán pomocí elektromagnetického míchadla.

Spektrofotometrická měření byla prováděna na spektrofotometru Agilent 8453 (Agilent, Kalifornie, USA) s křemennými kyvetami s tloušťkou absorbující vrstvy 1 cm.

Produkty elektrolýzy byly identifikovány pomocí chromatografické metody HPLC s DAD detekcí, resp. LC-MS/MS na těchto přístrojích:

- 1) Waters® Quattro PremierXE s pumpou Waters 1525 $\mu$  Binary HPLC Pump a detektorem Waters 2487 Dual  $\lambda$  Absorbance Detektor (Waters, Massachusetts, USA) s kolonou HyPurity C8, 150 x 3 mm, 5  $\mu\text{m}$  (Thermo Scientific, Dubuque, USA).
- 2) HPLC obsahující PU-2089 gradientovou pumpu (Quaternary Gradient Pump) s odvzdušňovačem (Jasco International Co., Tokyo, Japonsko) vybavená vstřikovacím ventilem Rheodyne Model 7125, doplněná spektrofotometrickým detektorem s diodovým polem MD-2010 (Jasco International Co., Tokyo, Japonsko) s kolonou TC-C18 (4,6 x 250mm, 5  $\mu\text{m}$ , Agilent, Kalifornie, USA)

Získaná data byla zpracovávána off-line pomocí tabulkového procesoru Origin 8.0. Statistické zpracování dat bylo prováděno podle Eckschlagera [61].

## 2.3 Pracovní postupy

### 2.3.1 Voltametrie a coulometrie

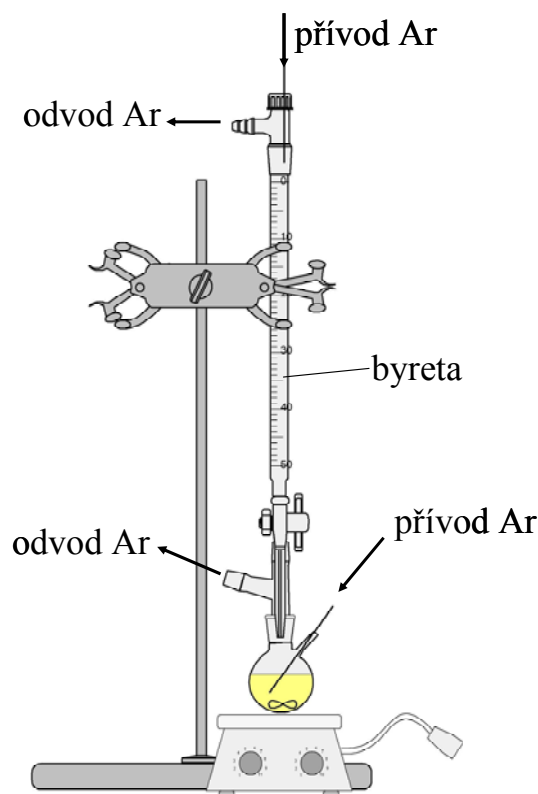
Měření voltametrických křivek bylo prováděno ve vodném roztoku základního elektrolytu nebo za přítomnosti 40% ethanolu (v/v). Nejprve byl připraven roztok základního elektrolytu obsahující Brittonův – Robinsonův pufr nebo roztok  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  chloridu draselného (KCl) s  $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  hydroxidem draselným (KOH). Před vstupem argonu do nádoby byla zařazena promývačka naplněná ethanollem. Roztok studované látky o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  byl připraven v roztoku ethanolu nebo ve vodném prostředí. Takto připravený roztok byl pod argonovou atmosférou převeden do předem vybublané polarografické nádoby. Poté byl proveden záznam voltametrické křivky. Před každým dalším záznamem byl roztok opět probubláván. Mezi měřeními byla elektroda opláchnuta deionizovanou vodou, důkladně vyleštěna pomocí aluminu ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) nanesená na jemném leštícím filcu DP-Nap (Struers, Roztoky u Prahy, Česká republika) a opět opláchnuta. Takto obnovený povrch elektrody byl připraven k dalšímu měření. Dlouhodobým opakovaným měřením bylo zjištěno, že látka není citlivá na světlo. Nebylo tedy nutné měřit v elektrochemické nádobce stíněné proti přístupu světla.

Coulometrické měření bylo prováděno v míchaném roztoku za stálého probublávání argonem v nádobce s odděleným anodickým a katodickým prostorem. Jako pracovní elektroda zde byla použita elektroda ze skelného uhlíku, pokud není uvedeno jinak. Katodický prostor byl naplněn předem odkysličeným roztokem základního elektrolytu.

### 2.3.2 Titrační měření

Při titračním měření bylo postupováno, pokud není uvedeno jinak, následujícím způsobem. Nejprve byl připraven roztok studované látky o koncentraci  $6,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  za nepřístupu vzduchu, který byl převeden do odměrné baňky pod argonovou atmosférou. Pro stanovení disociační konstanty  $\text{pK}_1$  quercetinu byl použit titrační roztok KOH o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  a pro stanovení disociační konstanty  $\text{pK}_2$  byl použit roztok KOH o koncentraci  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Tyto roztoky byly předem vybublány inertním plynem. V případě luteolinu byl použit roztok KOH o koncentracích  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  a  $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  pro stanovení disociačních konstant  $\text{pK}_1$  a  $\text{pK}_2$ . Před vlastní titrací byl do

odměrné baňky přidán acidobazický indikátor bromthymolová modř nebo fenolftalein. Celé titrační měření bylo prováděno v inertní atmosféře argonu, schéma použité aparatury je na obr. 4.



**Obr. 4:** Schéma titrační aparatury.

### 2.3.3 Chromatografická měření

Při chromatografickém měření s detektorem s diodovým polem (DAD) bylo postupováno, pokud není uvedeno jinak, následujícím způsobem. Chromatografická separace byla provedena na koloně s reverzní fází TC-C18. Pro separaci byla použita rozpouštědla (A): vodný roztok 0,1% kyseliny trifluoroctové (TFA) a (B): acetonitril s 0,1% TFA. Byl také využit gradient: 0-5 min 85 % A a 15 % B, 5-30 min lineární gradient do 50 % A a 50 % B, 30-40 min lineární gradient do 30 % A a 70 % B, 40-50 min 10 % A a 90 % B. Průtok byl nastaven na  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  a nástrikový objem byl  $20 \mu\text{l}$ . Sběrné parametry pro DAD byly v rozsahu vlnových délek 200-650 nm, krok byl nastaven na 4 nm.

Při chromatografickém měření s hmotnostním spektrometrem bylo postupováno následujícím způsobem. Chromatografická separace byla prováděna na koloně HyPurity C8 s reverzní fází. Program byl nastaven na gradientovou eluci s rozpouštědly (A): destilovaná

voda a (B): acetonitril. Gradient byl nastaven následujícím způsobem: 0-2 min 95 % A a 5 % B, 2-30 min lineární gradient do 40 % A a 60 % B, 30-35 min lineární gradient do 0 % A a 100 % B. Průtok byl nastaven na  $0,2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  s nástřikovým objemem  $5 \mu\text{l}$ . Optický detektor byl nastaven na vlnové délky 250 nm a 280 nm. Vzorek byl následně analyzován na hmotnostním spektrometru v negativním režimu s parametry: napětí elektrospreje 2,7 kV, vstupní čočka 40 V, vytahovací čočka 4 V a stejnosměrné napětí na RF čočkách bylo 0.0V. Srážková energie byla nastavena na 20 eV. Průtok plynu byl  $50 \text{ l} \cdot \text{h}^{-1}$  a teplota zdroje byla nastavena na  $100^\circ\text{C}$ , desolvatační teplota dusíku byla  $300^\circ\text{C}$ . Data byla zpracována v programu MassLynx V 4.1.

### 2.3.4 Spektrofotometrické měření

Při spektrofotometrických měřeních s Brittonovými – Robinsonovými pufrů bylo postupováno následujícím způsobem:  $80 \mu\text{l}$  studované látky o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  v methanolu bylo převedeno do odměrné baňky obsahující 5 ml roztoku Brittonova – Robinsonova pufru (pH 4,3 – 11,2) a 40 % methanolu (v/v). Tento roztok byl převeden do speciálně upravené křemenné kyvety (měrné tloušťky 1 cm) se septem, které zamezí přístupu vzduchu. Vzorek byl proměřen na spektrofotometru (HP 8452A) vůči pozadí Brittonův – Robinsonův pufr : methanol (3:2; v/v).

Roztoky studovaných látek o koncentraci  $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  byly měřeny také v roztoku  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  KCl s  $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  KOH. Měření bylo provedeno ve stejné křemenné kyvetě, v rozmezí vlnových délek 200-700 nm a to ve všech případech. Jako pozadí sloužil roztok  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  KCl s  $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  KOH.

Absorpční spektra byla měřena v inertní atmosféře argonu. Při měření vlivu působení kyslíku na změnu absorpčního spektra studované látky byla absorpční spektra měřena po otevření kyvety v intervalu 40 s. Míchání bylo prováděno ručně.

### 3. Výsledky a diskuze

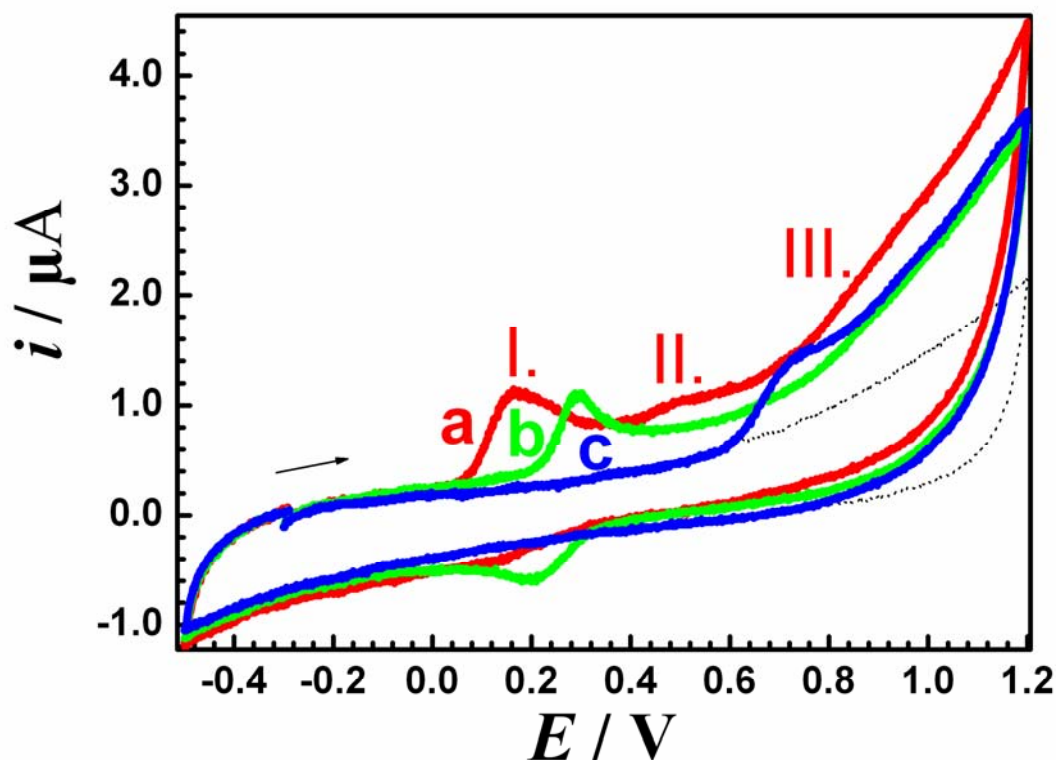
Hlavní studovanou látkou je quercetin (obr. 2) a pro srovnání oxidačních vlastností sledujeme i luteolin (obr. 3A) a apigenin (obr. 3B). Luteolin a apigenin mají velice podobnou chemickou strukturu, která se liší pouze o jednu respektive o dvě hydroxylové skupiny. V chemické struktuře je vidět, že luteolin neobsahuje hydroxylovou skupinu v poloze 3 a apigenin neobsahuje ještě hydroxylovou skupinu v poloze 4'. Počet a umístění hydroxylových skupin v chemické struktuře těchto látek významně ovlivňuje elektrochemické a acidobazické vlastnosti těchto flavonoidů. Elektrochemickým vlastnostem ve vodném roztoku se věnuje kap 3.1. K určení mechanismu oxidace quercetinu ve vodném roztoku je nezbytná znalost jeho acidobazických vlastností. Stanovením disociační konstanty quercetinu a luteolinu se zabývá kap. 3.2. Celkový mechanismus oxidace je popsán v kap. 3.4. K jeho určení významně přispívá identifikace oxidačních produktů, kap. 3.3. Byl také studován vliv přítomnosti vzdušného kyslíku na stabilitu studovaných látek, kap 3.5.

#### 3.1 Elektrochemické chování

##### 3.1.1 Cyklická voltametrie quercetinu, luteolinu a apigeninu

Cyklické voltamogramy quercetinu, luteolinu a apigeninu byly měřeny na elektrodě ze skelného uhlíku ve směsi Brittonův – Robinsonův pufr pH 6,9 a ethanol (3:2; v/v) (obr. 5). Molekula quercetinu (obr. 2) obsahuje ve své chemické struktuře pět hydroxylových skupin. Porovnáním elektrochemických vlastností chemicky příbuzných látek, tj. luteolinu a apigeninu, lze určit elektroaktivní místo v molekule quercetinu. Quercetin vykazuje tři oxidační vlny v rozmezí potenciálů od -0,5 V do +1,2 V (obr. 5, křivka a). Luteolin, který má pouze čtyři hydroxylové skupiny, vykazuje pouze dvě oxidační vlny (obr. 5, křivka b). Je patrné, že druhá oxidační vlna quercetinu u +0,5 V (II.) souvisí s přítomností hydroxylové skupiny C3-OH na kruhu C, která u luteolinu chybí. Apigenin obsahuje pouze tři hydroxylové skupiny a oxiduje se při nejvyšším potenciálu v porovnání s ostatními studovanými látkami. Porovnáním cyklických voltamogramů těchto látek při stejné hodnotě pH lze říci, že první oxidační vlna quercetinu (I.) a luteolinu je způsobena oxidací 3',4'-dihydroxybenzylu v jejich molekule [59,62]. Tato dvoelektronová oxidační vlna je

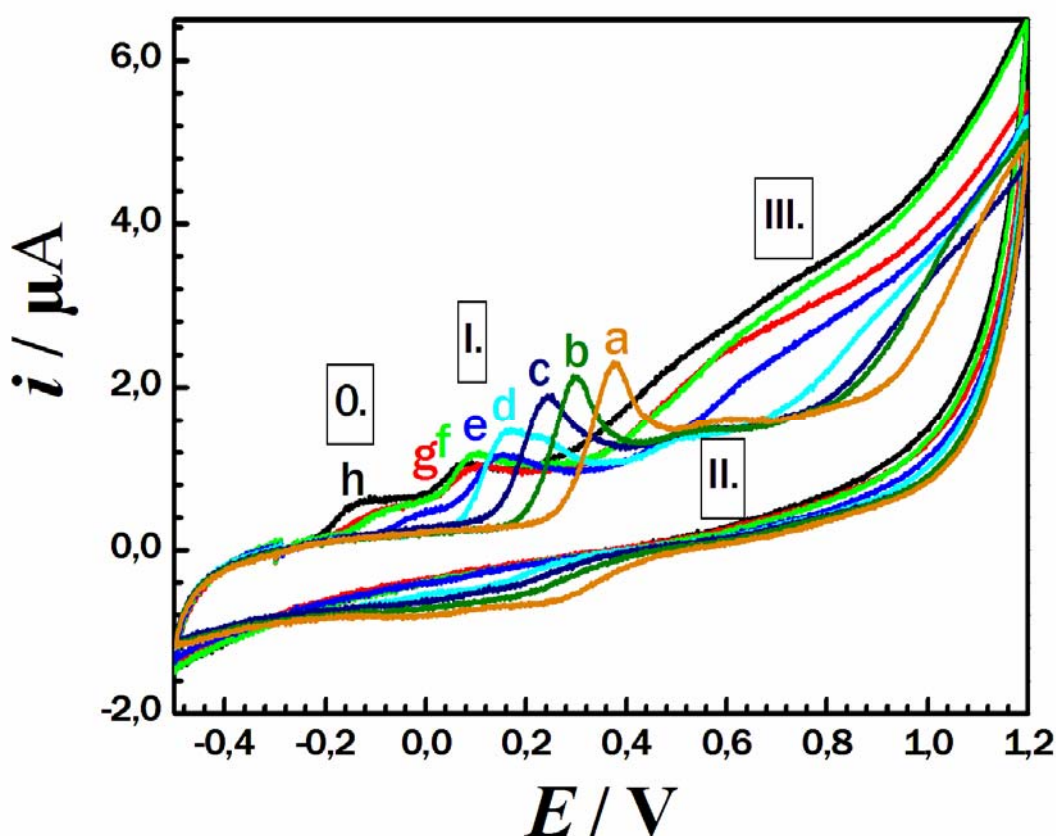
quasireversibilní. K oxidaci hydroxylových skupin na kruhu A v molekule quercetinu dochází při hodnotách potenciálu vyšších než +0,6 V obdobně jako u apigeninu. První oxidační vlna luteolinu (obr. 5, křivka b) vykazuje větší reversibilitu než vlna (I.) v případě quercetinu. Je patrné, že v případě quercetinu se uplatňuje chemická reakce, která spotřebovává oxidační produkt vzniklý po prvním elektronovém přenosu.



**Obr. 5:** Cyklický voltamogram na elektrodě ze skelného uhlíku pro  $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  a) quercetin, b) luteolin, c) apigenin ve směsi Brittonův – Robinsonův pufr pH 6,9 a ethanol (3:2; v/v). Cyklický voltamogram základního elektrolytu je znázorněn tečkovanou čarou. Rychlost polarizace  $0,25 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ .

### 3.1.2 pH závislost

Vliv pH na chování quercetinu při cyklických voltamogramech na elektrodě ze skelného uhlíku byl sledován v Brittonově – Robinsonově pufru v rozmezí pH 4,3 až 11,2. Zaznamenané křivky ukazují obr. 6 a obr. 7.



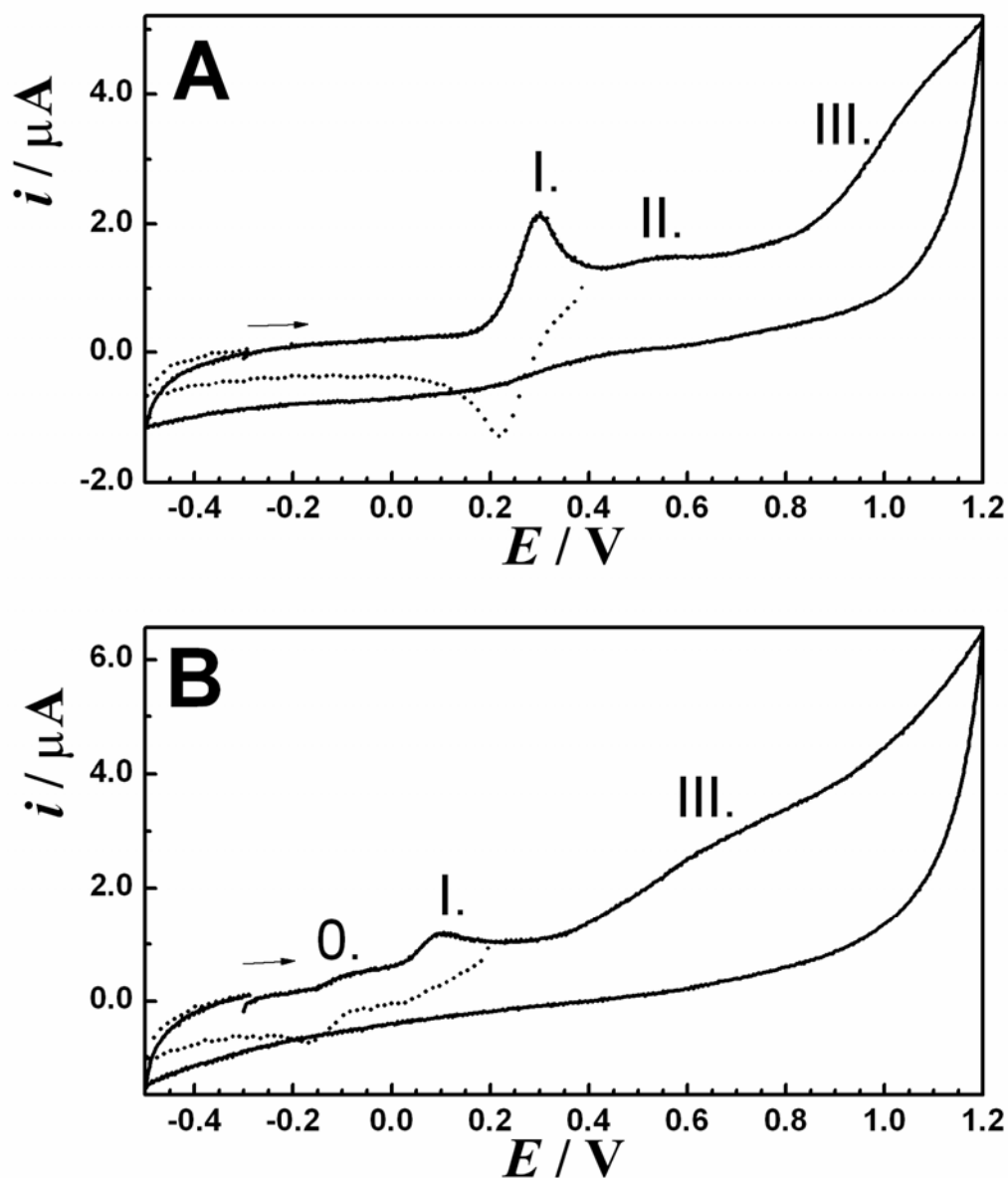
**Obr. 6:** Cyklický voltamogram  $4 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  quercetinu na elektrodě ze skelného uhlíku v Brittonově – Robinsonově pufru při různých hodnotách pH: 4,3 (a); 5,3 (b); 6,1 (c); 6,9 (d); 8,9 (e); 10,5 (f); 10,9 (g); 11,2 (h). Rychlost polarizace  $0,25 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ . Voltamogramy měřeny od  $-0,3 \text{ V}$  přes  $+1,2 \text{ V}$  do  $-0,5 \text{ V}$  a zpět.

Quercetin v roztoku o pH 5,3 vykazuje tři oxidační vlny (obr.6, křivka b a obr.7A). První dvoulektroková oxidační vlna (I.) při  $+0,3 \text{ V}$  je quasireversibilní. S rostoucí hodnotou pH dochází k posunu potenciálu oxidačních vln quercetinu směrem k nižším hodnotám potenciálu. Z tohoto je patrné, že na celkovém mechanismu oxidace se účastní vodíkové ionty. Současně se snižuje výška první a druhé oxidační vlny. Z obr. 6 je vidět, že druhá oxidační vlna (II.) vymizí při pH 8,9. Tato oxidační vlna přísluší oxidaci produktu, který vznikne oxidací quercetinu na první oxidační vlně. Je vidět, že tvorba oxidačního produktu

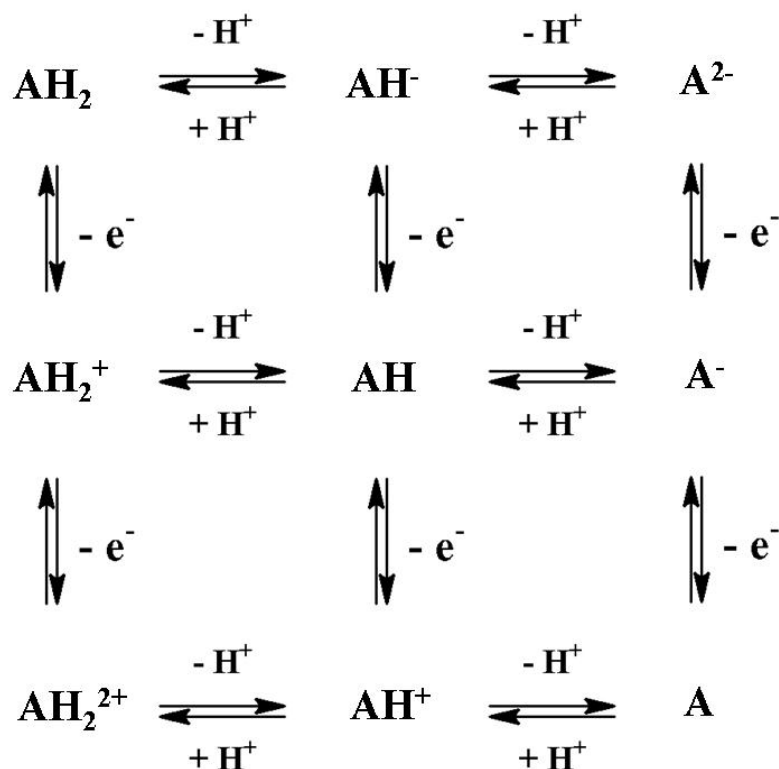


se pravděpodobně při pH vyšších než 6,9 neuplatňuje nebo se oxidační produkt při těchto hodnotách pH neoxiduje.

Při hodnotě pH 8,9 dochází zároveň k objevení nové quasireversibilní oxidační vlny (0.) při potenciálu 0,0 V. Tato oxidační vlna je jednoelektronová a s rostoucí hodnotou pH se zvyšuje a posouvá k negativnějším hodnotám potenciálu. To znamená, že elektronovému přenosu předchází chemická reakce (deprotonace), která určuje rychlost elektrodové reakce. Vlna (0.) přísluší oxidaci disociované formy, pravděpodobně dianionu  $A^{2-}$  (schéma 1), jak vyplývá z hodnoty disociační konstanty  $pK_1$  a  $pK_2$  (viz kap. 3.2). Vztah elektronového přenosu a disociačních reakcí při oxidaci flavonoidů ukazuje schéma 1, které poprvé publikoval Jacq [63]. Toto schéma ukazuje souvislost mezi víceelektronovou oxidací látky  $AH_2$  a její disociací do prvního stupně na anion  $AH^-$  charakterizovaný disociační konstantou  $pK_1$  nebo disociací do druhého stupně na dianion  $A^{2-}$  charakterizovaný disociační konstantou  $pK_2$ . Počet elektronů účastnících se elektronového přenosu byl určen z množství předaného náboje coulometricky při konstantním potenciálu.

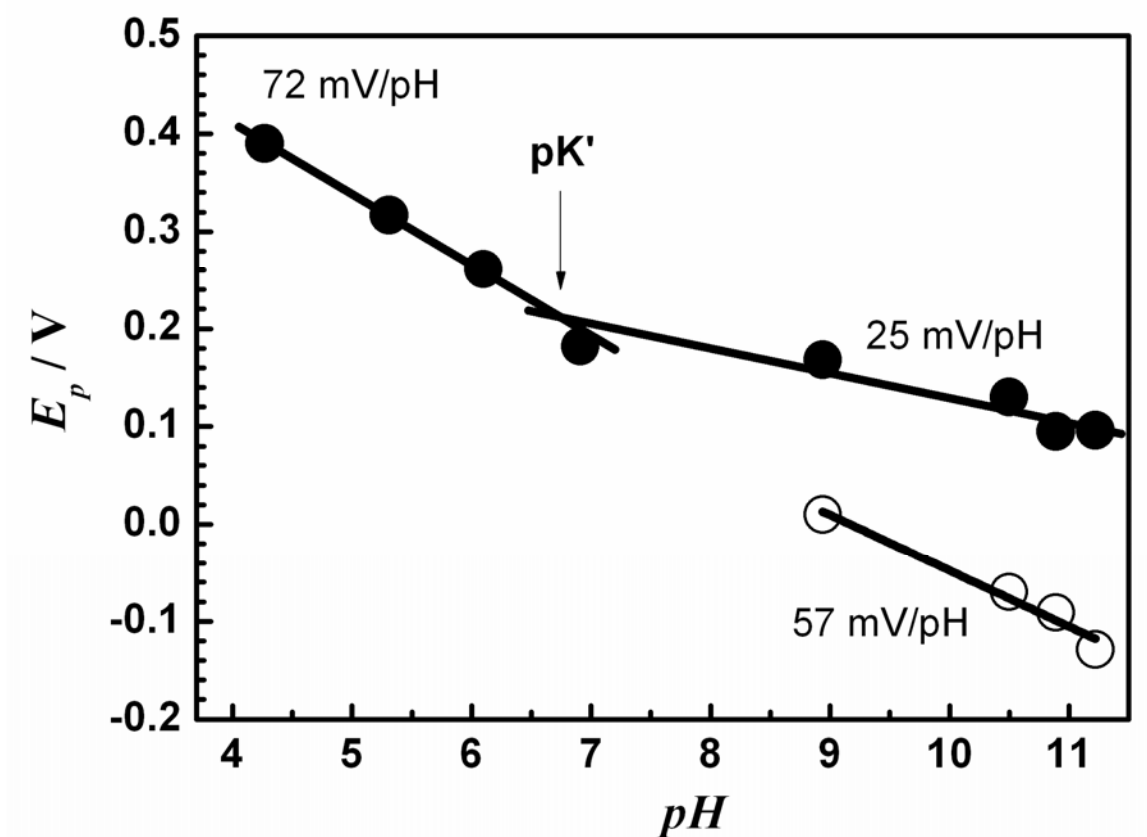


**Obr. 7:** Cyklický voltamogram  $4 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  quercetinu na elektrodě ze skelného uhlíku v Brittonově – Robinsonově pufru při různých hodnotách pH A) 5,3; B) 10,5. Rychlost polarizace  $0,25 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ . Voltamogramy měřeny od  $-0,3 \text{ V}$  přes  $+1,2 \text{ V}$  do  $-0,5 \text{ V}$  a zpět.



**Schéma 1:** Obecné schéma „carré“ zavedené Jacqem [63].

Závislost potenciálu píku  $E_p$  na pH (obr.8) je charakterizována dvěma přímkovými závislostmi  $E_p = 0,698 - 0,072 \cdot \text{pH}$  v rozmezí pH 4,3 – 6,9 a  $E_p = 0,379 - 0,025 \cdot \text{pH}$  v rozmezí pH 6,9 – 11,5. Průsečík těchto přímek se nazývá zdánlivá disociační konstanta  $\text{pK}'$ . Při oxidaci se uplatňuje protonizace a je možné určit stechiometrický počet iontů  $\text{H}^+$  účastnících se elektrodového děje [64]. Ze směrnice  $72 \text{ mV} \cdot \text{pH}^{-1}$  lze usuzovat, že na oxidačním mechanismu quercetinu v rozmezí 4,3 – 6,9 se podílí dva elektrony a dva protony. Pro disociovanou hodnotu quercetinu  $\text{AH}^-$  je zjištěná směrnice  $25 \text{ mV} \cdot \text{pH}^{-1}$  a to odpovídá výměně  $2\text{e}^-/1\text{H}^+$ . Směrnice zjištěná pro oxidační vlnu (0.)  $57 \text{ mV} \cdot \text{pH}^{-1}$  se blíží teoretické hodnotě  $59 \text{ mV} \cdot \text{pH}^{-1}$ . Jelikož bylo zjištěno, že dochází k přenosu jednoho elektronu při oxidaci dianionu se účastní jeden proton. Tento fakt je v souladu se zjištěnou existencí předřazené disociace, která je řídicím dějem rychlosti oxidace  $\text{A}^{2-}$ .



**Obr. 8:** Závislost  $E_p$  na pH pro quercetin: ● (I.)vlna, ○ (0.)vlna.

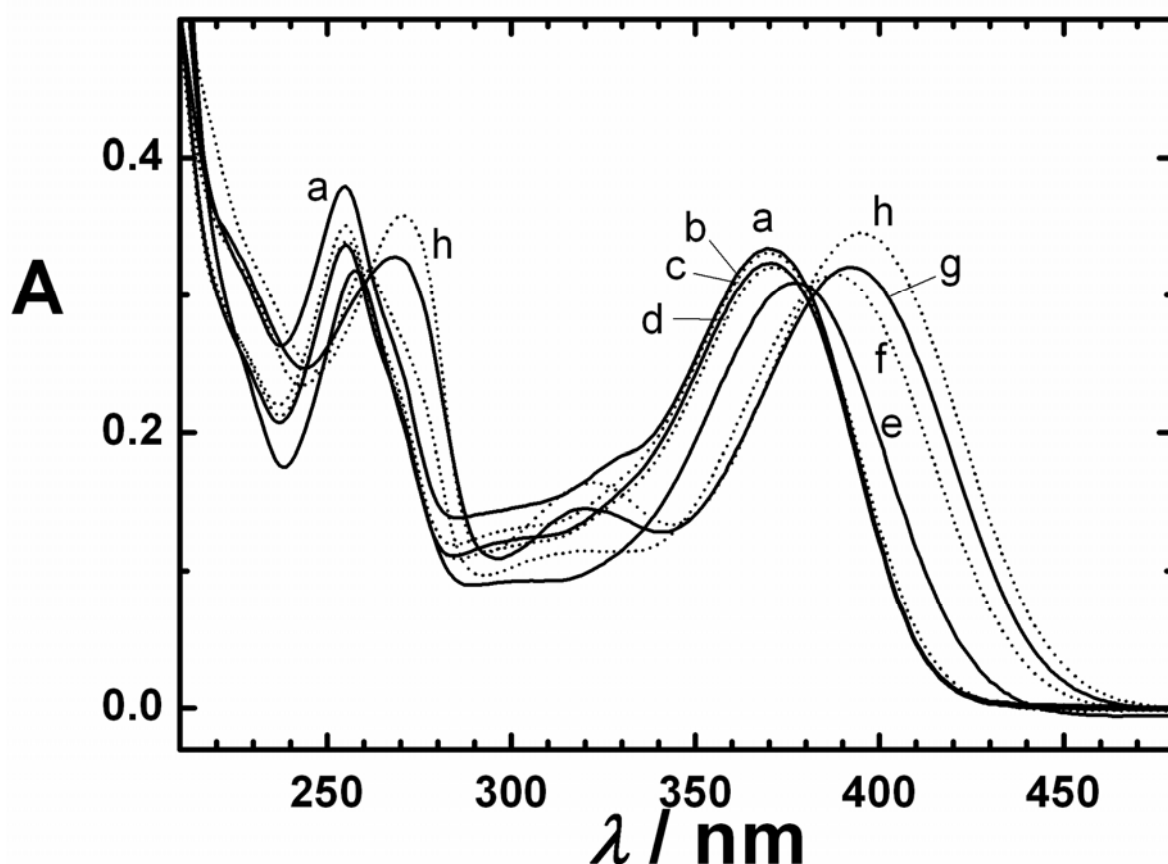
### 3.2 Stanovení disociační konstanty

Hodnota disociační konstanty quercetinu a luteolinu byla určována v inertní atmosféře argonu dvěma nezávislými metodami, spektrofotometricky a acidobazickou titrací.

Znalost disociační konstanty studovaných látek je nutná pro specifikaci jejich redoxních vlastností. Avšak jejich správné určení je spojeno s problémem nestability zásobního roztoku v přítomnosti vzdušného kyslíku. Oxidační degradace flavonoidů byla popsána v literatuře několika autory [12,54,55,56,57,58], přesto vliv kyslíku na disociační konstantu nebyl nikdy studován. Nicméně hodnoty disociační konstanty quercetinu uváděné v literatuře se výrazně liší: 5,7 [35], 6,74 [36], 7,03 [37], 7,36 [38], 7,7 [39], 8,21 [40], 9,0 [41].

### 3.2.1 Stanovení disociační konstanty spektrofotometricky

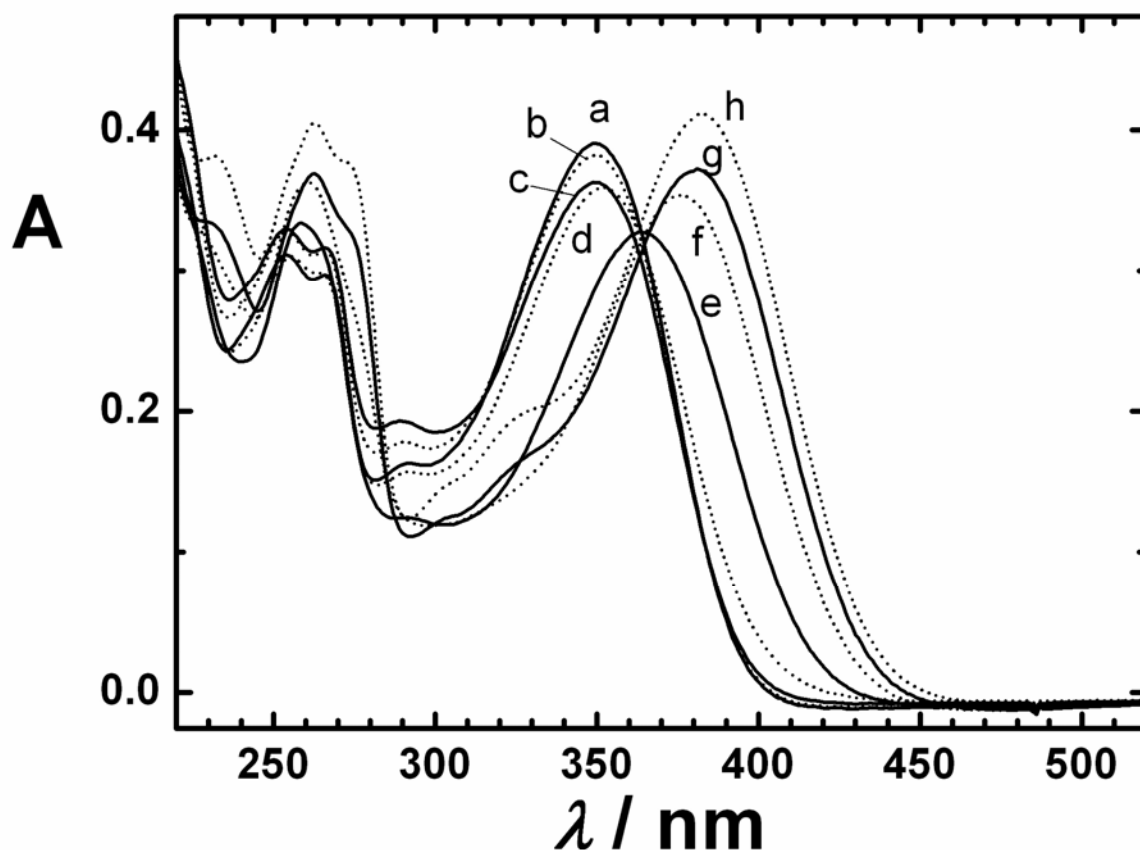
Disociační konstanta quercetinu a luteolinu byla vyhodnocena z absorpčních spekter v Brittonově – Robinsonově pufru za nepřítomnosti kyslíku, obr. 9. Všechna měření včetně přípravy roztoků byla opakována třikrát. Absorpční spektrum quercetinu při  $\text{pH} = 2,0$  je charakterizováno pásy s absorpčním maximem při 202 nm, 255 nm a 370 nm. Pásky při 255 nm a 370 nm se snižují s rostoucí hodnotou  $\text{pH}$  a podléhají bathochromnímu posunu. Pás s absorpčním maximem 395 nm se zvyšuje s rostoucí hodnotou  $\text{pH}$ . Tato změna je charakterizována dvěma isosbestickými body u 261 nm a 380 nm.



**Obr. 9:** Absorpční spektrum  $1,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  quercetinu v roztoku Brittonova – Robinsonova pufru a 40% methanolu (v/v) s různou hodnotou  $\text{pH}$ : 2,1 (a); 3,0 (b); 4,0 (c); 5,1 (d); 6,0 (e); 7,0 (f); 8,0 (g); 9,0 (h).

Absorpční spektra luteolinu byla také měřena v inertní atmosféře argonu, aby se zamezilo přístupu kyslíku. Absorpční spektrum luteolinu při  $\text{pH} = 2,0$  je charakterizováno pěti pásy s absorpčními maximy 206 nm, 254 nm, 266 nm, 292 nm a 349 nm, obr 10.

Absorpční pásy 254 nm a 266 nm se mírně zvyšují při změně pH k vyšším hodnotám. Intenzita absorpčního pásu 349 nm se snižuje s hodnotou pH, přičemž intenzita absorpčního pásu s maximem 382 nm roste. Tato změna je charakterizována isosbestickým bodem při 364 nm.



**Obr. 10:** Absorpční spektrum  $1,4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  luteolinu v prostředí Brittonova – Robinsonova pufru a 40% methanolu (v/v) s různými hodnotami pH: 2,1 (a); 3,0 (b); 4,0 (c); 5,1 (d); 6,0 (e); 7,0 (f); 8,0 (g); 9,0 (h).

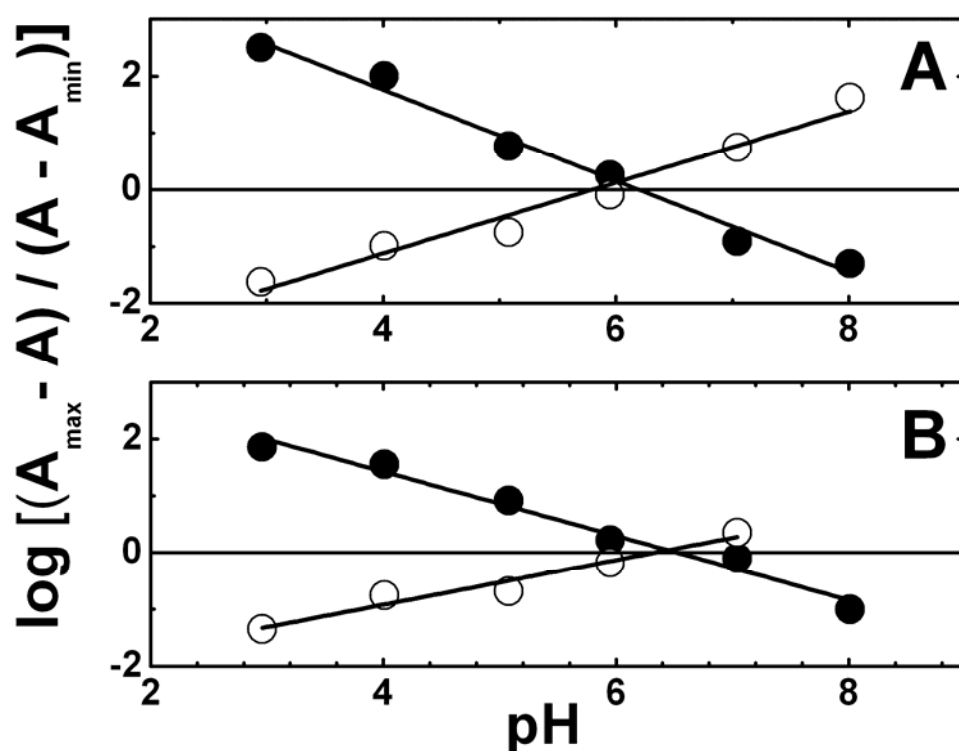
Disociační konstanta určující acidobazickou rovnováhu se dá určit z rovnice [32,65] pomocí měření závislosti absorbance na pH.

$$\text{pH} = \text{pK} + \log \frac{(A_{\text{max}} - A)}{(A - A_{\text{min}})} \quad (1)$$

kde  $A_{\text{max}}$  a  $A_{\text{min}}$  jsou maximální absorbance naměřené při maximální a minimální hodnotě pH křivek.

V případě quercetinu byla  $pK_1 = 5,89 \pm 0,83$  určena ze změny absorbance při vlnové délce 357 nm a 420 nm (obr. 11A). Data byla zpracována statistickými metodami [61]. Nedostatečná přesnost při vyhodnocování disociační konstanty je pravděpodobně způsobena překryvem absorpčních pásů.

V případě luteolinu byla  $pK_1 = 6,34 \pm 0,99$  vypočtena ze změny absorbance při vlnové délce absorpčních maxim 349 nm a 400 nm (obr. 11B). Tvorba nového absorpčního pásu u 328 nm a překrytí absorpčních pásů jednotlivých disociačních forem může být důvodem vysoké chyby stanovení  $pK_1$  luteolinu.



**Obr. 11:** Určení disociační konstanty, závislost  $\log [(A_{\max} - A) / (A - A_{\min})]$  vs. pH A) pro quercetin  $\lambda$  (nm): ● 357, ○ 420, a B) pro luteolin  $\lambda$  (nm): ● 349, ○ 400.

Silný vliv vzdušného kyslíku na absorpční spektra byl nalezen jak u vodného tak u alkoholového prostředí.

### 3.2.2 Stanovení disociační konstanty titračně

Stanovení disociační konstanty quercetinu a luteolinu pomocí acidobazické titrace byla provedena v inertní atmosféře argonu ve zvlášť upravené aparatuře (obr. 4). Stanovení disociačních konstant acidobazickou titrací je výrazně přesnější než spektrofotometrické vyhodnocení. Výsledné hodnoty jsou shrnuty v tab 1. Hodnoty disociačních konstant quercetinu uváděné v literatuře [35,36,37,38,39,40,41] jsou pravděpodobně ovlivněny přítomností kyslíku v používaných roztocích. Hodnota  $pK_1$  quercetinu nalezená v této práci za nepřístupu vzduchu se blíží nejnižší hodnotě  $pK_1$  quercetinu publikované v literatuře autory Escandar a kol. [35]. Další vyšší hodnoty  $pK_1$  quercetinu v literatuře mohou souviset s produkty rozkladu vlivem kyslíku. Problematikou vlivu kyslíku na absorpční spektrum obou látek se zabývá kap. 3.5.

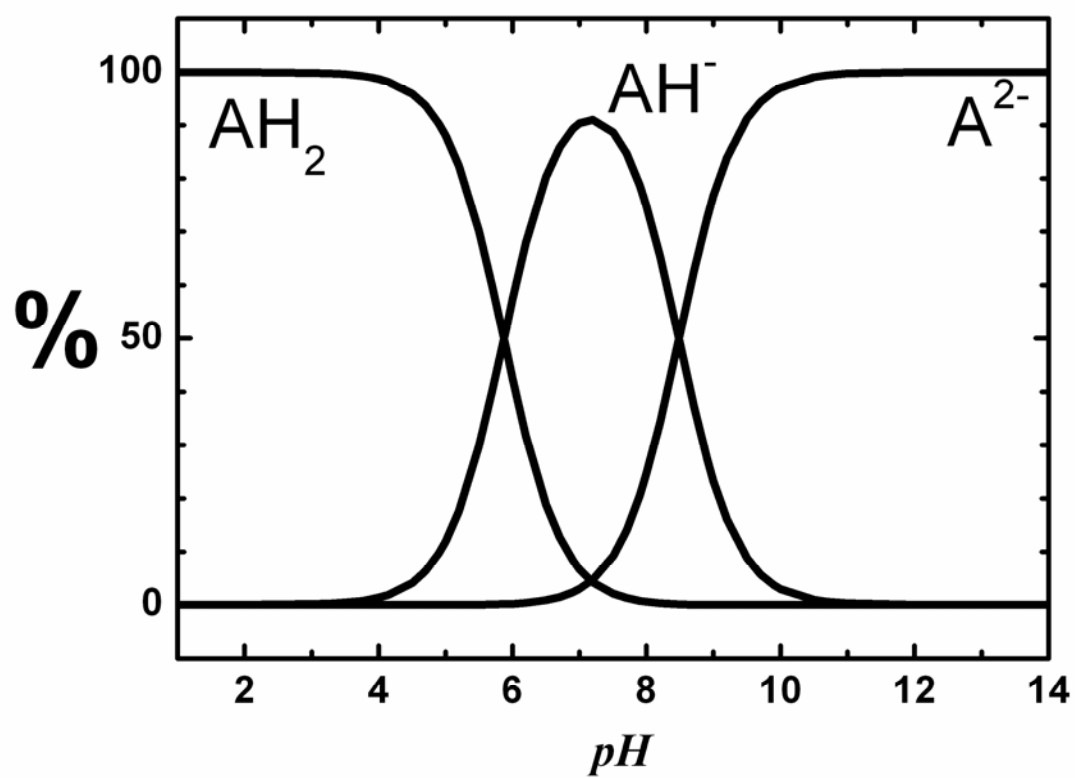
**Tab. 1:** Stanovené disociační konstanty pro quercetin a luteolin.

	$pK_1$		$pK_2$	
	spektrofotometricky	titračně	spektrofotometricky	titračně
<b>Quercetin</b>	$5,89 \pm 0,83^a$	$5,87 \pm 0,14^b$	---	$8,48 \pm 0,09^a$
<b>Luteolin</b>	$6,34 \pm 0,99^a$	$5,99 \pm 0,32^c$	---	$8,40 \pm 0,42^a$

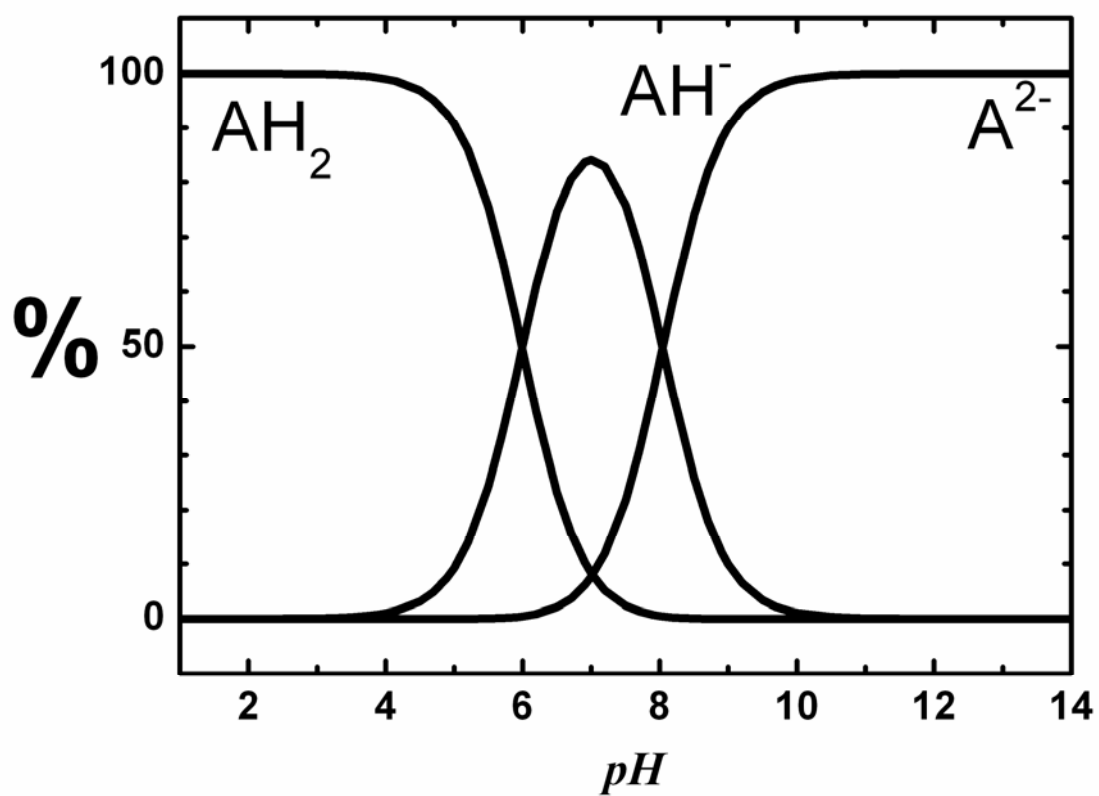
<sup>a</sup> počet měření  $n = 3$ , <sup>b</sup>  $n = 9$ , <sup>c</sup>  $n = 13$

Distribuční diagramy quercetinu (obr. 12) a luteolinu (obr. 13) ukazují jednotlivé rozložení disociačních forem těchto látek. Distribuční diagramy byly vypočteny použitím hodnot  $pK_1$  a  $pK_2$  z titračního měření. Hodnota disociační konstanty  $pK_1$  quercetinu je nižší než hodnota disociační konstanty  $pK_1$  luteolinu. Tento fakt odpovídá chemické struktuře těchto látek ovlivněné přítomností C3-OH skupiny v quercetinu. Hodnoty disociační konstanty  $pK_2$  obou látek jsou podobné. Je zřejmé, že hydroxylová skupina C3-OH nemá významný vliv na disociaci hydroxylové skupiny v poloze 7 (obr. 2 a 3).





Obr. 12: Distribuční diagram quercetinu.

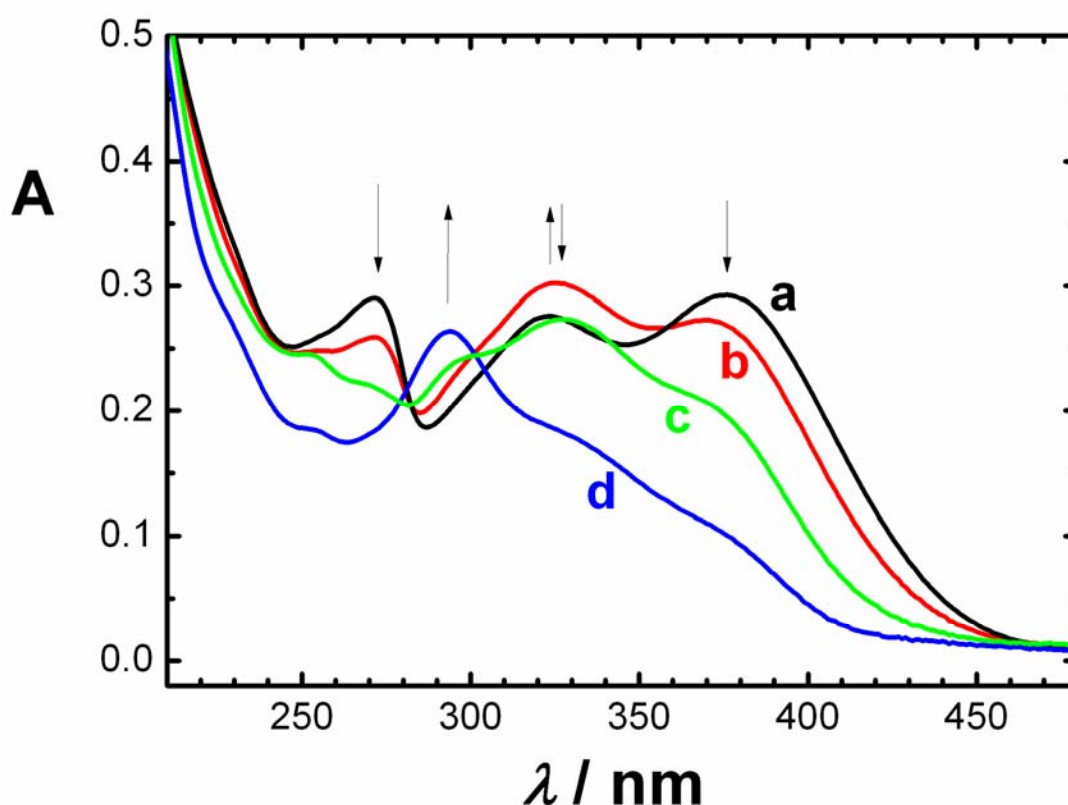


Obr. 13: Distribuční diagram luteolinu.

### 3.3 Reakční produkty

Pro zjišťování oxidačních produktů byl zvolen vodný roztok quercetinu v  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  KCl s  $4\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  KOH. V tomto prostředí bylo možné pracovat s roztoky quercetinu o koncentraci  $1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  a vyvarovat se použití ethanolu. Přítomnost ethanolu by mohla ovlivnit vznik oxidačních produktů vlivem možné nukleofilní adice ethanolu na chinonový meziprodukt. Nukleofilní adice rozpouštědla na chinony je popsána v literatuře [66].

Konečné produkty oxidace byly identifikovány analýzou složek roztoku po částečné nebo úplné elektrolýze při konstantním potenciálu za (0.) a (I.) oxidační vlnou. Náboj spotřebovaný při elektrolýze při potenciálu oxidační vlny (0.) odpovídá přenosu jednoho elektronu, náboj spotřebovaný při elektrolýze při potenciálu oxidační vlny (I.) odpovídá přenosu tří elektronů. Toto je v souladu s faktem, že oxidační vlna (0.) je jednoelektronová a při oxidaci na vlně (I.) dochází k přenosu dvou elektronů.

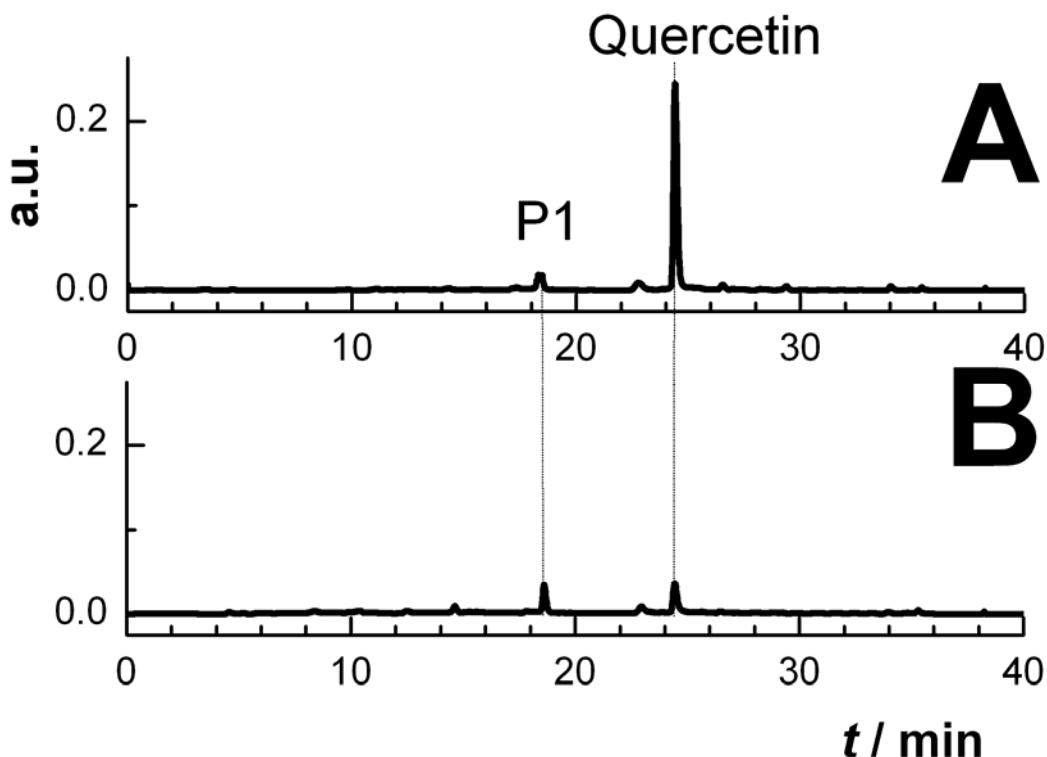


**Obr. 14:** Absorpční spektrum  $1,9\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  quercetinu měřené během elektrolýzy v roztoku  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  KCl s  $4\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  KOH v čase a) 0 min, b) 130 min, c) 280 min, d) 600 min.

Obr. 14 ukazuje absorpční spektrum quercetinu během elektrolýzy. Absorpční spektrum je charakterizováno pásy s absorpčním maximem při 272 nm, 324 nm a 376 nm. Během elektrolýzy se objevuje nový pás 293 nm, který se zvyšuje v závěrečné části elektrolýzy. Obr. 14 vyobrazuje absorpční spektrum odpovídající absorpčnímu spektru 2-(3',4'-dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3-(2*H*)-onu čili produktu P1 [57].

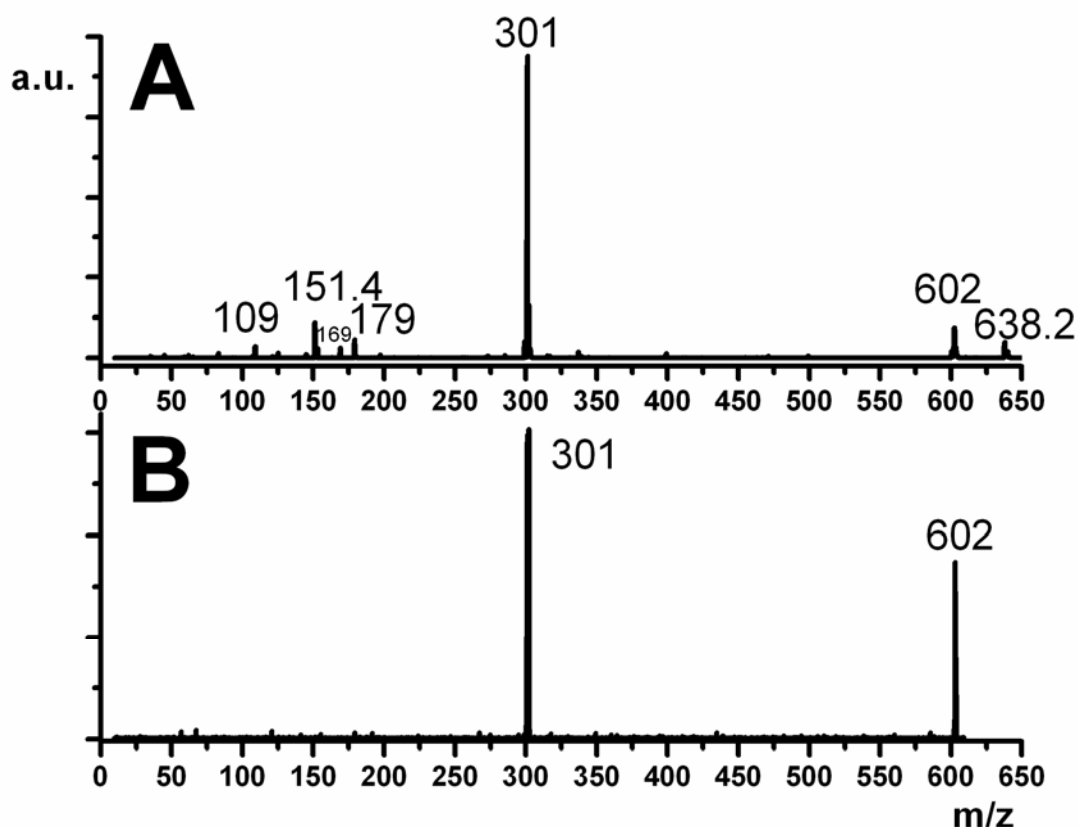
Během elektrolýzy se začala tvořit sraženina. Po ukončení elektrolýzy byla sraženina nejprve odstředěna za nepřístupu vzduchu. Roztok nad sraženinou byl odebrán a použit k analýze. Kapalinový chromatogram roztoku quercetinu před elektrolýzou a roztoku po elektrolýze při potenciálu +1,0 V ukazuje obr. 15.

Obr. 15A vyobrazuje kapalinový chromatogram roztoku quercetinu před elektrolýzou. V retenčním čase  $t_R = 24$  min je vidět pík elektrolyzované látky quercetinu. V chromatogramu je patrný také nízký pík produktu P1 u  $t_R = 18$  min je zřejmé, že quercetin je náchylný na oxidaci kyslíkem. Chromatogram na obr. 15B ukazuje nárůst výšky píku oxidačního produktu P1. Výška přísluší koncentraci této látky v roztoku po odstranění sraženiny.



**Obr. 15:** Kapalinový chromatogram quercetinu A) před elektrolýzou a B) po elektrolýze při +1,0 V. Průtok:  $0,2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ , nástríkový objem  $5 \text{ } \mu\text{l}$ , optický detektor při 250 nm. Gradientová eluce rozpouštědly destilovanou vodou a acetonitrilem je popsána v kap. 2.3.3.

Oddělená sraženina, vzniklá během elektrolyzy, byla rozdělena na dvě části. Jedna část byla následně třikrát promyta destilovanou vodou a vysušena na Petriho misce v sušárně (60 – 70 °C). Poté byla sraženina rozpuštěna v acetonitrilu a nastříknuta do hmotnostního spektrometru. S druhou částí se pracovalo za nepřístupu vzduchu. Sraženina byla sušena pod proudem argonu a promývána destilovanou vodou, která byla předem odkysličená. Tento proces byl třikrát opakován. Po úplném vysušení byl vzorek rozpuštěn v acetonitrilu a analyzován pomocí LC-MS/MS.

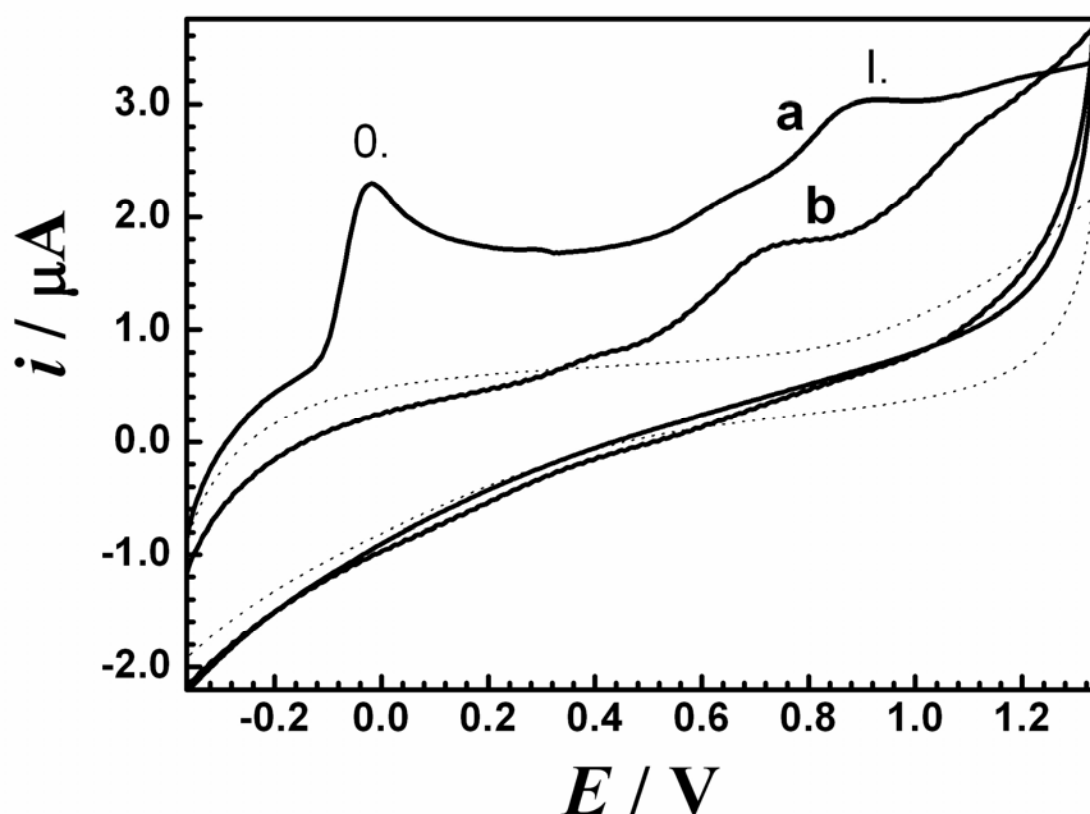


**Obr. 16:** Hmotnostní spektrum ESI<sup>-</sup> A) sraženiny rozpuštěné v acetonitrilu, B) rozpadové spektrum  $m/z$  602 (dimer), [2M<sup>-</sup>].

Na obr.16A je zobrazeno hmotnostní spektrum sraženiny rozpuštěné v acetonitrilu jejíž molekulární ion je v negativním módu  $m/z$  301. Molekulární ion  $m/z$  602 byl izolován a následně fragmentován v iontové pasti. Dceřiné spektrum je zachyceno na obr. 16B. Toto spektrum potvrzuje přítomnost dimeru. Tato látka byla zjištěna také pomocí LC-MS/MS

v retenčním čase  $t_R = 34$  min a to pouze v roztoku sraženiny, která byla sušena za nepřístupu vzduchu.

Cyklický voltamogram (obr. 17, křivka b) měřený po elektrolýze quercetinu při +1,0 V vykazuje dvě oxidační vlny. První vlna při potenciálu +0,73 V přísluší oxidaci nasyceného roztoku dimeru. Druhá oxidační vlna při +1,14 V je oxidace disociované formy quercetinu  $AH^\cdot$ .

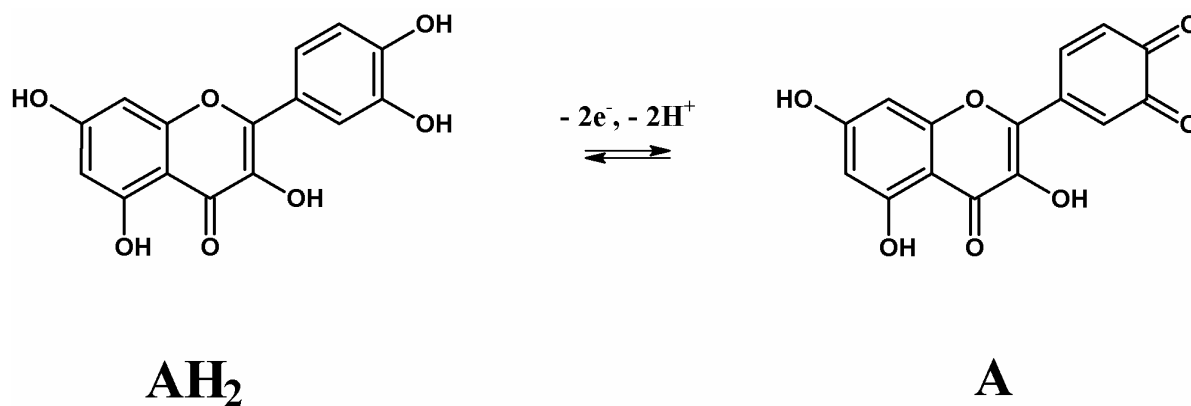


**Obr. 17:** Cyklický voltamogram  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  quercetinu měřený na elektrodě ze skelného uhlíku a) před elektrolýzou a b) po elektrolýze při +1,0 V v roztoku  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  KCl s  $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  KOH. Cyklický voltamogram základního elektrolytu je znázorněn tečkovanou čarou. Rychlost polarizace  $0,065 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ .

### 3.4 Mechanismus oxidace

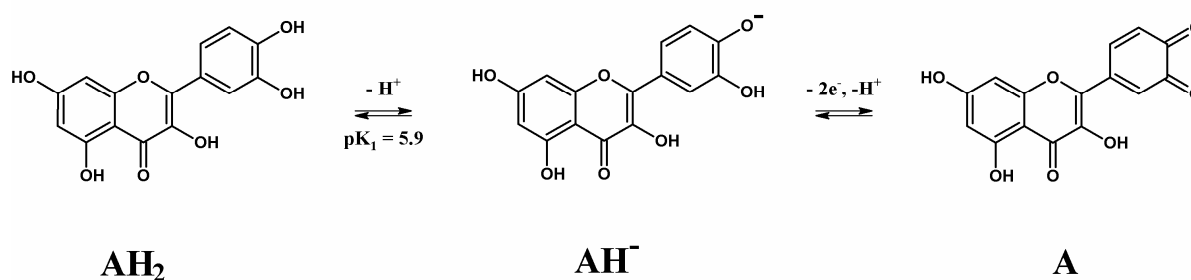
Přehled literatury ukázal, že elektrochemickou oxidaci studovalo již několik autorů, kteří však neuvažovali vliv kyslíku. V této kapitole je popsán výzkum, který vedl k určení mechanismu oxidace a k identifikaci konečných produktů. Naše nedávné výsledky ukazují, že pouze jeden konečný oxidační produkt je tvořen v nepřítomnosti kyslíku v nevodném prostředí [58].

Na základě uvedených výsledků byl navržen mechanismus oxidace quercetinu. Schéma 2 ukazuje mechanismus oxidace nedisociované molekuly quercetinu vedoucí k odštěpení dvou elektronů a dvou protonů.



**Schéma 2:** Oxidace quercetinu na chinoidní produkt.

V neutrálním prostředí podléhá molekula quercetinu disociaci (viz distribuční diagram, obr. 12). Oxidační mechanismus ukazuje schéma 3.

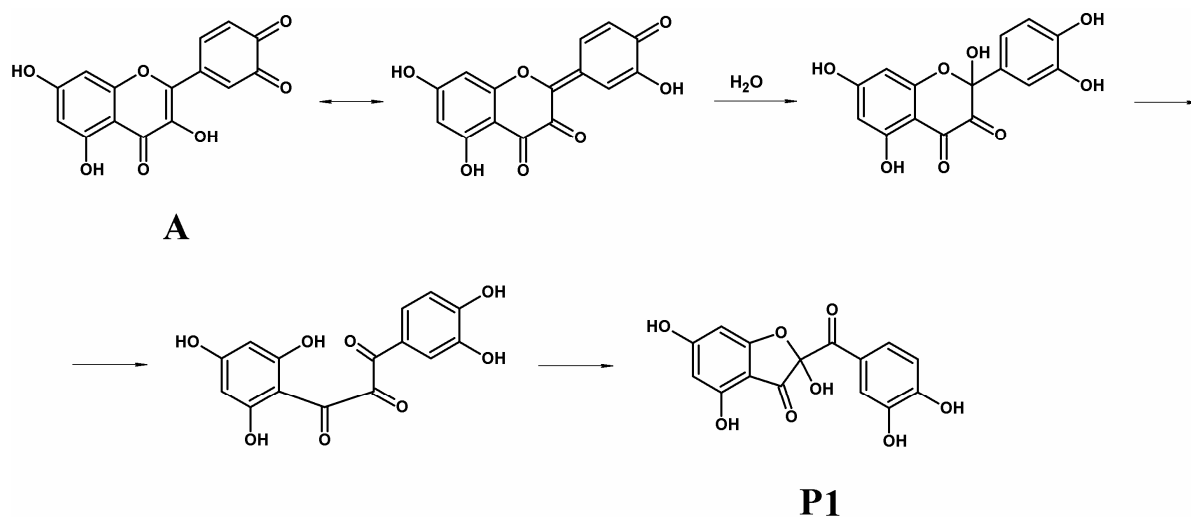


**Schéma 3:** Oxidační mechanismus quercetinu v neutrálním prostředí.

V zásaditém prostředí byl zjištěn přenos jednoho elektronu a jednoho protonu. Ze závislosti  $\delta E_p / \delta \log \nu = 19 \text{ mV}$  lze usuzovat, že dochází k disproportionaci nebo dimerizaci.

Anion radikál vytvořený odevzdáním jednoho elektronu z molekuly dianionu  $A^{2-}$  podléhá tzv. radikál-radikál dimerizaci. Tomu nasvědčuje závislost  $\delta E_p / \delta \log v = 39 \text{ mV}$  [67]. Vzhledem k nízkému výtěžku vytvořeného dimeru lze dimerizaci považovat za vedlejší reakci při posuzování celkového mechanismu oxidace.

Chinon, který vzniká oxidací quercetinu, podléhá další chemické reakci za vzniku produktu P1, jak ukázalo měření absorpčních spekter (obr. 14). Schéma 4 ukazuje jeho hydroxylaci [58]. Uvedeným mechanismem vzniká oxidační produkt 2-(3',4'-dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3(2H)-on (P1). Tento hlavní produkt oxidace quercetinu se však vlivem kyslíku dále rozkládá jak je ukázáno v kap. 3.5.3.



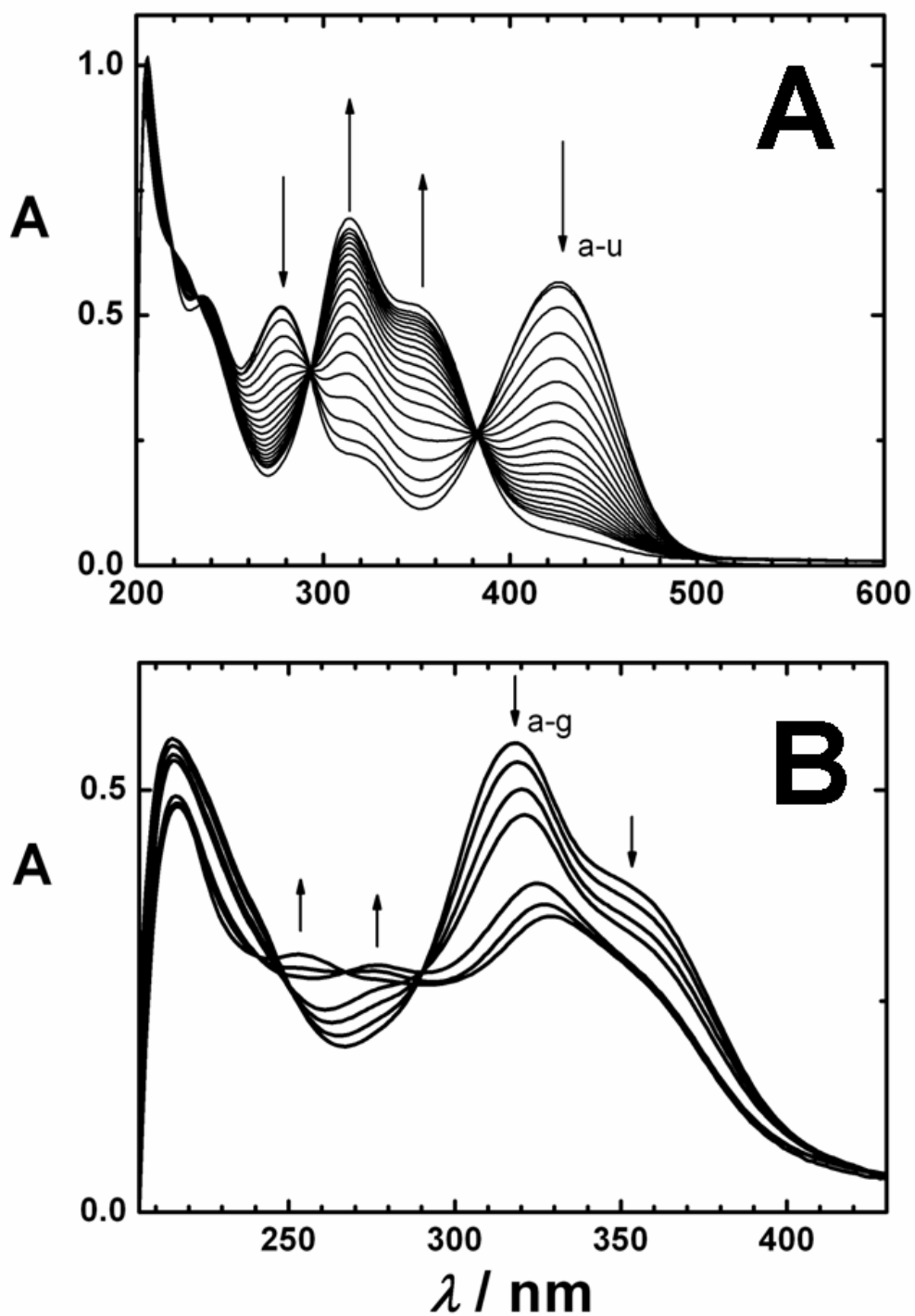
**Schéma 4:** Vznik hlavního oxidačního produktu quercetinu.

### 3.5 Vliv přítomnosti kyslíku

#### 3.5.1 Quercetin

Vliv přítomnosti vzdušného kyslíku na stabilitu studovaných látek byl sledován několika způsoby, např. chromatograficky a UV-Vis spektrofotometrií. Obr. 18 ukazuje závislost absorpčního spektra quercetinu na době vystavení působení vzdušného kyslíku. Absorpční spektrum quercetinu v argonové atmosféře je charakterizováno pásy s absorpčním maximem při 205 nm, 277 nm, 313 nm a 425 nm (obr. 18A). Během oxidace vzdušným kyslíkem se objevuje nový pás s maximem 352 nm a dochází ke zvyšování intenzity pásu při vlnové délce 320 nm. Intenzita absorpčních pásů při 277 nm a 425 nm se snižuje. Pokles absorpčního pásu při 277 nm je doprovázen mírným bathochromním posunem. Isosbestické body jsou při vlnových délkách 219 nm, 233 nm, 293 nm a 382 nm. Křivka u na obr. 18A ukazuje absorpční spektrum odpovídající absorpčnímu spektru 2-(3',4'-dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3(2*H*)-onu čili produktu P1 získanému při elektrooxidaci quercetinu (Schéma 2 - 4) [56,58]. Podobnou změnu absorpčního spektra quercetinu našli Dangles a kol. [38,68] po reakci s jodistanem draselným nebo dusičnanem ceričitým amonným. Je patrné, že také v těchto případech chemické oxidace quercetinu vzniká produkt P1. Reaktivita quercetinu se vzdušným kyslíkem zřejmě odpovídá jeho redoxním vlastnostem při elektrooxidacích. V kap. 3.3 a 3.4 bylo zjištěno, že oxidace quercetinu běží přes chinoidní meziprodukt. Jako hlavní produkt byl nalezen 2-(3',4'-dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3(2*H*)-on (P1). Vznik chinoidního meziproduktu nemá vliv ani na absorpční spektrum ani na ostrost isosbestického bodu. Chinon poměrně rychle podléhá chemické reakci za vzniku produktu P1. Další působení kyslíku (obr. 18B) způsobí snížení absorpčních pásů při 314 nm a 352 nm a dojde k objevení nového pásu při 277 nm. Vznik dalšího absorpčního pásu při 253 nm naznačuje, že produkt P1 podléhá dalším degradačním procesům.





**Obr. 18:** Absorpční spektra  $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  quercetinu v  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  KCl a  $3,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  KOH. A) Během působení vzdušného kyslíku po a) 0, b) 40, c) 80, d) 120, e) 160, f) 200, g) 240, h) 280, i) 320, j) 360, k) 400, l) 440, m) 480, n) 520, o) 560, p) 600, r) 640, s) 680, t) 720, u) 800 s a změna absorpčního spektra po delším časovém úseku B) a) 161 min, b) 215 min, c) 298 min, d) 395 min, e) 22h 34 min, f) 54h 8 min, g) 72h 15 min.

Předpokládáme-li, že koncentrace kyslíku je v nadbytku vzhledem ke koncentraci quercetinu, lze oxidační přeměnu považovat za monomolekulární reakci. Rychlostní konstantu ( $k_1$ ) přeměny látky X lze určit ze vztahu (2), resp. (3) [69,70].

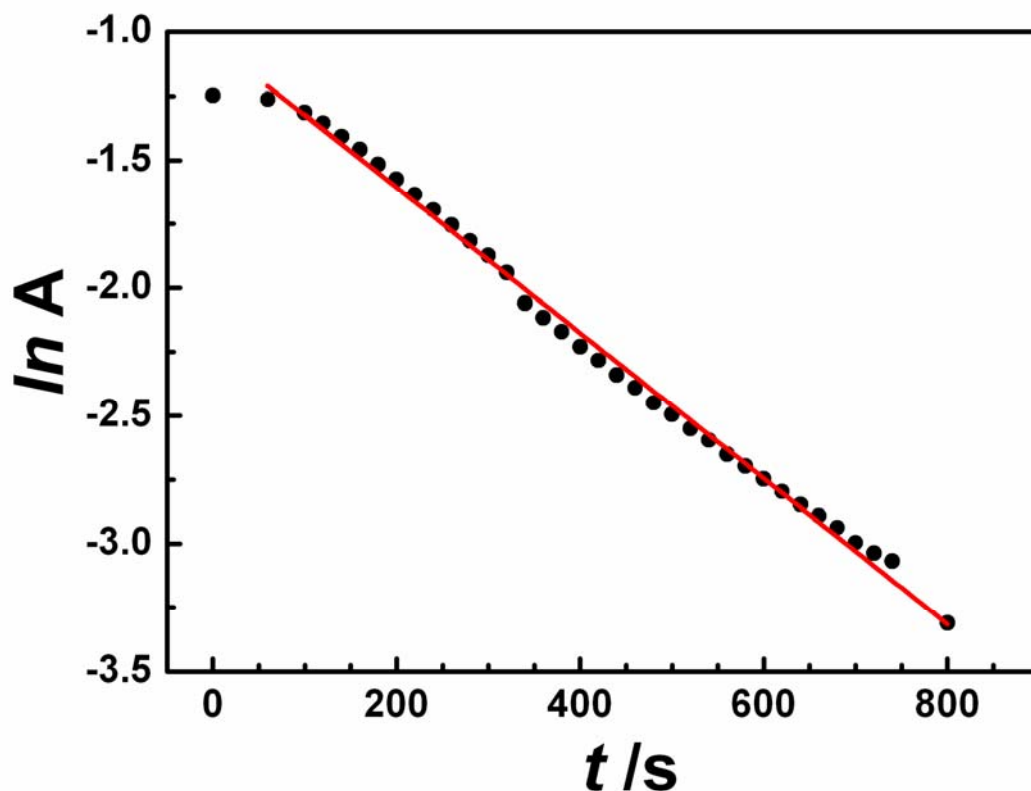
$$[X] = [X]_0 e^{-k_1 t} \quad (2)$$

Po zlogaritmování

$$\ln[X] = \ln[X]_0 - k_1 t \quad (3)$$

kde  $t$  je doba měření,  $[X]$  je okamžitá koncentrace látky v čase  $t$  a  $[X]_0$  je koncentrace látky v čase  $t = 0$ . Závislost  $\ln[X]$  na čase podle vztahu (3) graficky znázorňuje obr. 19, kde změna absorbance odpovídá změně koncentrace látky.

Přímková závislost potvrdila, že oxidační přeměnu quercetinu lze řešit jako reakci 1. řádu. Směrnice udává rychlostní konstantu  $k_1 = 2,85 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ .

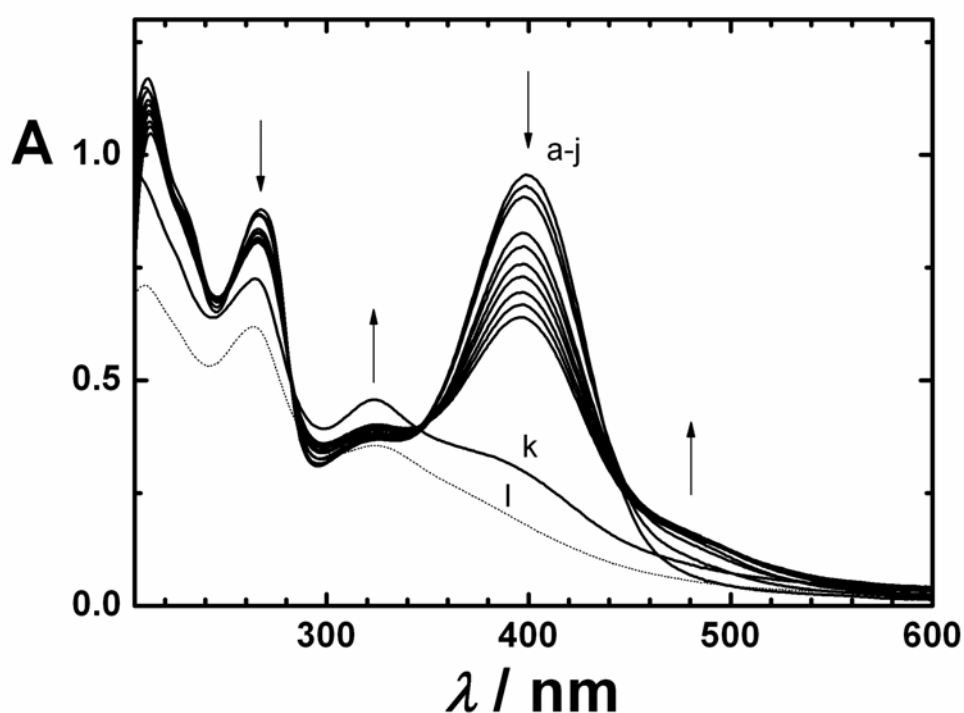


**Obr. 19:** Časová změna logaritmu absorbance quercetinu při 425 nm na čase.

Je zřejmé, že změny absorpčního spektra probíhají během několika sekund. To znamená, že čerstvě připravený roztok, i když by se použil v co nejkratším čase, obsahuje již oxidační produkt. Proto je nutné používat pečlivě odkysličená rozpouštědla. Příprava zásobních roztoků quercetinu je velice složitá z důvodů nutnosti odkysličení.

### 3.5.2 Luteolin

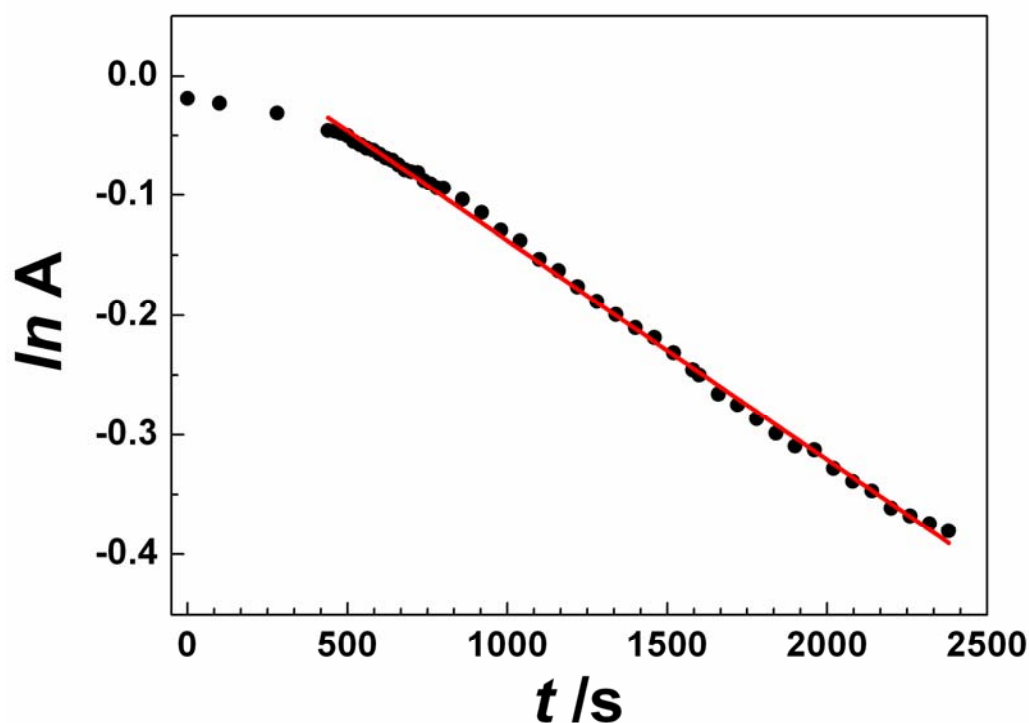
Luteolin ve vodném prostředí vykazuje podobné chování jako quercetin. Absorpční spektrum luteolinu (obr. 20) je charakterizováno čtyřmi absorpčními pásy, a to 211 nm, 267 nm, 324 nm a 399 nm. Během působení kyslíku se intenzita absorpčních pásů při vlnových délkách 267 nm a 399 nm snižuje. Pokles obou absorpčních pásů je doprovázen mírným hypsochromním posunem. Intenzita absorpčního pásu při 324 nm se mírně zvyšuje.



**Obr. 20:** Absorpční spektra luteolinu o koncentraci  $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  v  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  KCl a  $3,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  KOH během expozice vzdušným kyslíkem a) 0 s, b) 500 s, c) 740 s, d) 1240 s, e) 1480 s, f) 1720 s, g) 1920 s, h) 2160 s, i) 2400 s, j) 2700 s, k) 24 h, l) 168 h.

Tato změna (obr. 20, křivky a-k) je charakterizována isosbestickými body při 282 nm a 347 nm. Absorpční spektrum produktu oxidace luteolinu obsahuje absorpční pásy při 220 nm, 240 nm, 260 nm, 324 nm, 395 nm a 480 nm. Absorpční spektrum roztoku po 24 h a 168 h ukazuje další snížení absorpčního pásu při vlnové délce 324 nm a vymizení pásu u 383 nm a 480 nm, bez přítomnosti isosbestického bodu. To znamená, že také v případě luteolinu dochází k dalšímu rozkladnému procesu.

Závislost  $\ln[X]$  na čase podle vztahu (3) graficky znázorňuje obr. 21, kde změna absorbance odpovídá změně koncentrace. Je zřejmé, že závislost je přímková a tudíž reakce se dá považovat za reakci 1. řádu. Rychlostní konstanta  $k_1 = 1,83 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  odpovídající směrnici je nižší než hodnota rychlostní konstanty oxidační přeměny quercetinu.

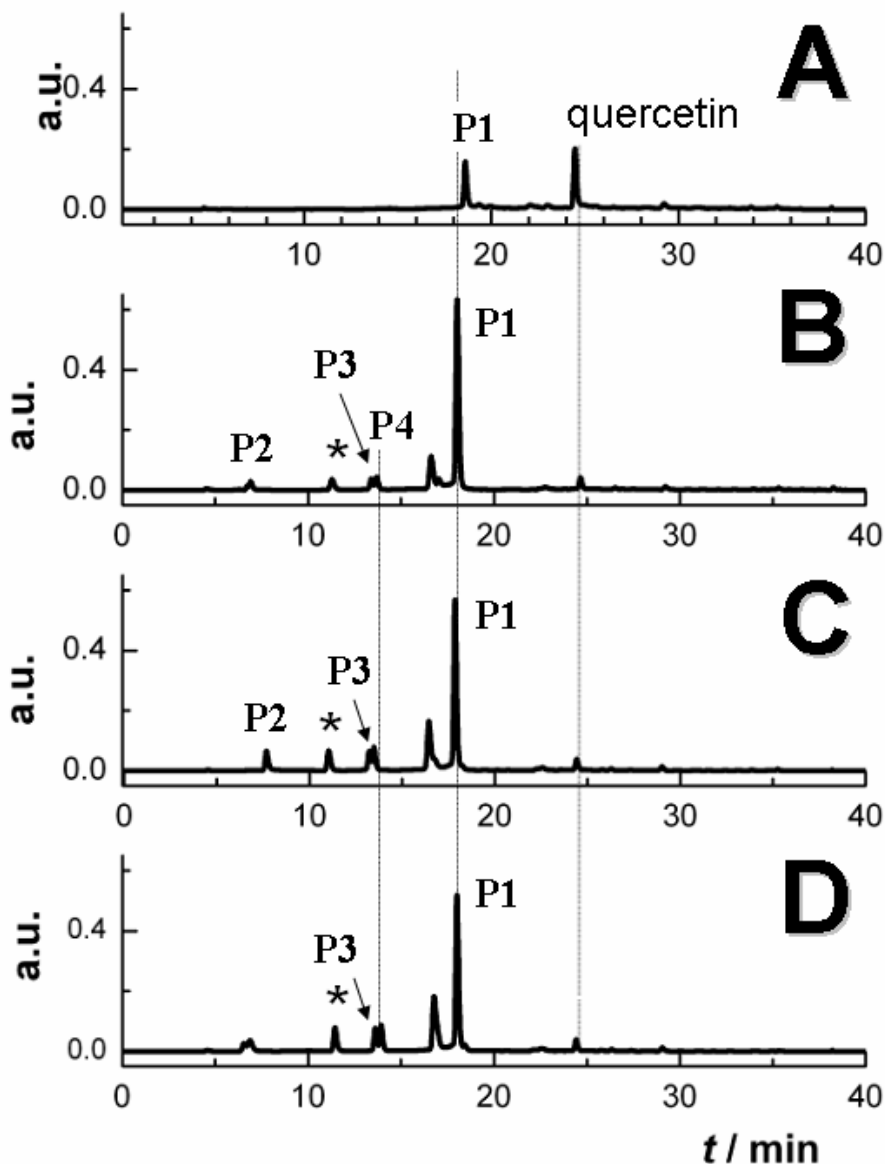


**Obr. 21:** Časová změna logaritmu absorbance luteolinu při 399 nm na čase.

Míra rozkladu luteolinu je nižší než u quercetinu, k oxidaci a změně absorpčních pásů dochází během několika minut. Toto chování vychází z rozdílů v chemické struktuře obou sloučenin a je v souladu s jejich redoxními vlastnostmi. Molekula quercetinu obsahuje o jednu hydroxylovou skupinu v poloze 3 (obr. 2 a 3) více než molekula luteolinu.

### 3.5.3 LC-MS/MS

Bylo zjištěno, že quercetin podléhá rozkladu za přístupu vzdušného kyslíku. Tento jev byl sledován pomocí LC-MS/MS analýzy. Roztok quercetinu byl vystaven působení kyslíku po dobu 130 min. Během této doby bylo sledováno zastoupení oxidačních produktů (obr. 22). Absorpční spektrum zaznamenané při retenčním čase píku P1 je v souladu s absorpčním spektrem získaným při spektrofotometrickém měření stálosti roztoků (obr. 18A, křivka u).



**Obr. 22:** Kapalinové chromatogramy quercetinu zaznamenané v různých časových expozicích vzdušným kyslíkem: A) 10 min, B) 50 min, C) 90 min, D) 130 min, \*) kolona. Průtok:  $0,2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ , nástríkový objem  $5 \mu\text{l}$ , optický detektor při 250 nm. Gradientová eluce rozpouštědly destilovanou vodou a acetonitrilem je popsána v kap. 2.3.3.

Hlavní oxidační produkt P1 se vlivem kyslíku rozkládá na řadu dalších hydroxysloučeniny jako 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-oxooctová kyselina (P2), 2,4,6-trihydroxybenzoová kyselina (P3) a 3,4-dihydroxybenzoová kyselina (P4). Píky byly rozpoznány díky srovnávání UV-Vis spekter popsaných v literatuře a potvrzeny LC-MS/MS analýzou. Charakterizace a identifikace produktů jsou popsány v tab. 2.

**Tab. 2:** Produkty oxidace vzdušným kyslíkem  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  v  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  KCl a  $3,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  KOH.

		Molekulární hmotnost	$m/z$	Absorpční maxima (nm)
<b>P1</b>	2-(3',4'-dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3(2H)-on	318	317 [M-1]	203, 295, 335
<b>P2</b>	2-(3,4-dihydroxyphenyl) -2-oxooctová kyselina	182	181 [M-1]	207, 231, 283, 311
<b>P3</b>	2,4,6-trihydroxybenzoová kyselina	170	169 [M-1]	203, 259, 295
<b>P4</b>	3,4-dihydroxybenzoová kyselina	154	153 [M-1]	215, 259, 295

Bylo prokázáno, že vlivem přítomnosti kyslíku dochází nejen ke tvorbě oxidačního produktu P1, ale také ke vzniku dalších rozkladných produktů, jak ukazuje schéma 5.

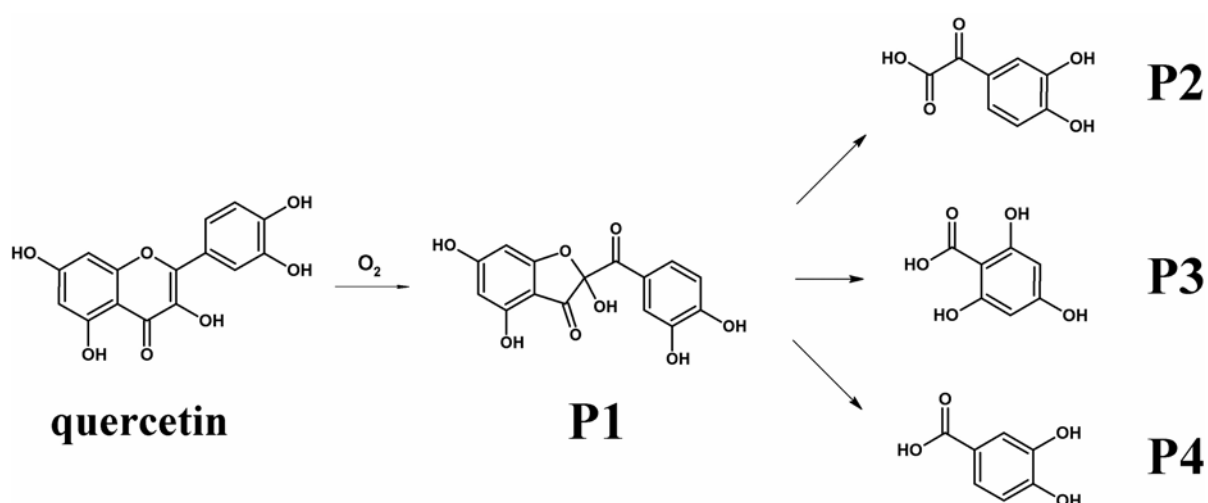


Schéma 5: Rozkladné produkty quercetinu.

## 4. Závěr

1. Bylo studováno elektrochemické chování chemicky příbuzných látek quercetinu, luteolinu a apigeninu. Porovnáním cyklických voltamogramů byla zjištěna elektroaktivní skupina v molekule studovaných látek. Quercetin vykazuje tři oxidační vlny, luteolin dvě a apigenin jednu oxidační vlnu. Jednotlivým oxidačním vlnám těchto látek byly přiřazeny elektroaktivní skupiny v jejich chemické struktuře.
2. Bylo zjištěno, že na celkovém mechanismu oxidace se účastní vodíkové ionty a že elektronový přenos je spojen s disociačními chemickými reakcemi v závislosti na pH prostředí.
3. Pro objasnění mechanismu oxidace bylo nutné zjistit disociační konstanty studovaných látek. Tyto hodnoty byly stanoveny v inertní atmosféře argonu pomocí dvou nezávislých metod, spektrofotometricky a acidobazickou titrací. Na základě  $pK_1 = 5,87 \pm 0,14$  a  $pK_2 = 8,48 \pm 0,09$  pro quercetin a  $pK_1 = 5,99 \pm 0,32$  a  $pK_2 = 8,40 \pm 0,42$  pro luteolin byly vypočteny distribuční diagramy těchto látek.
4. Byl navržen mechanismus oxidace quercetinu. Prvotně vzniklý chinon podléhá řadě rychlých chemických reakcí. Jako hlavní oxidační produkt byl určen 2-(3',4'-dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3(2H)-on. Tento produkt byl potvrzen spektrofotometricky a LC-MS/MS. Jako další oxidační produkt byl zjištěn dimer. Oba tyto produkty podléhají rozkladným procesům za přítomnosti vzduchu.
5. Vliv vzdušného kyslíku byl pozorován v případě quercetinu a luteolinu pomocí absorpční spektroskopie. Byla porovnána rychlostní konstanta rozkladu quercetinu  $k_1 = 2,85 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  a luteolinu  $k_1 = 1,83 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ .
6. Konečné produkty oxidace quercetinu byly identifikovány analýzou složek roztoku za přítomnosti vzdušného kyslíku pomocí metod LC-MS/MS a HPLC-DAD. 2-(3',4'-dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3(2H)-on se oxiduje na nízkomolekulární hydroxysloučeniny: 2-(3,4-dihydroxyphenyl) -2-oxooctovou kyselinu, 2,4,6-trihydroxybenzoovou kyselinu a 3,4-dihydroxybenzoovou kyselinu. Vznikající dimer se vlivem přítomnosti kyslíku rozkládá na původní látku.

## 5. Literatura

1. Cristea D., Vilarem G.: Dyes and Pigments **70**, 238, (2006).
2. Colombini M. P., Andreotti A., Baraldi C., Degano I., Łucejko J. J.: Microchemical Journal **85**, 174, (2007).
3. Heinrich J., Švarcová I., Valentová K.: Chemické Listy **102**, 245, (2008).
4. Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A. A., Capasso F.: Life Sciences **65**, 337, (1999).
5. Biesaga M., Pyrzynska K.: Critical Reviews in Analytical Chemistry **39**, 95, (2009).
6. Timberlake C. F., Henry B. S.: Endeavour **10**, 31, (1986).
7. De Rijke E., Out P., Niessen W. M. A., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U. A. T.: Journal of Chromatography A **1112**, 31, (2006).
8. Hollman P., Arts I.: Journal of the Science of Food and Agriculture **80**, 1081, (2000).
9. Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G.: Free Radical Biology & Medicine **20**, 933, (1996).
10. Kuhnau J.: World Review of Nutrition and Dietetics **24**, 117, (1976).
11. Srkalová S., Kalíková K., Tesařová E.: Chemické listy **102**, 480, (2008).
12. Timbola A. K., De Souza C. D., Giacomelli C., Spinelli A.: Journal of the Brazilian Chemical Society **17**, 139, (2006).
13. Simó C., Barbas C., Cifuentes A.: Electrophoresis **24**, 2431, (2003).
14. Goldberg D. M., Yan J., Soleas G. J.: Clinical Biochemistry **36**, 79, (2003).
15. Hertog M. G. L., Hollman P. C. H., van de Putte B.: Journal of Agricultural and Food Chemistry **41**, 1242, (1993).
16. Zielinska D., Pierozynski B.: Journal of Electroanalytical Chemistry **625**, 149, (2009).
17. Osman A., Makris D. P., Kefalas P.: Process Biochemistry **43**, 861, (2008).
18. Dadáková E., Vrchotová N., Tříška J., Kyseláková M.: Chemické listy **97**, 558, (2003).
19. Makris D. P., Rossiter J. T.: Food Chemistry **77**, 177, (2002).
20. Turan B., Gülsen A., Makris D. P., Kefalas P.: Food Research International **40**, 819, (2007).
21. Xiao M., Shao Y., Yan W., Zhang Z.: Journal of Chemical Thermodynamics **43**, 240, (2011).
22. Husain S. R., Cillard J., Cillard P.: Phytochemistry **26**, 2489, (1987).



23. Sugihara N., Arakawa T., Ohnishi M.: *Free Radical Biology & Medicine* **11/12**, 1313, (1999).
24. Kobayashi T., Nakata T., Kuzumaki T.: *Cancer Letters* **176**, 17, (2002).
25. Matsuda H., Morikawa T., Ando S., Togucida I., Yoshikawa M.: *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **11**, 1995, (2003).
26. Čopíková J., Uher M., Lapčík O., Moravcová J., Drašar P.: *Chemické listy* **99**, 802, (2005).
27. Zhou A., Sadik O. A.: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 12081, (2008).
28. Zenkevich I. G., Eshchenko A. Y., Makarova S. V., Vitenberg A. G., Dobryakov Y. G., Utsal V. A.: *Molecules* **12**, 654, (2007).
29. Bezpečnostní list, Sigma Aldrich pro quercetin (Q0125), luteolin (L9283) a apigenin (10798).
30. Laviron E.: *Journal of Electroanalytical Chemistry* **146**, 15, (1983).
31. Lalor G. C.: *Journal of the Society of Dyers and Colourists* **78**, 549, (1962).
32. Bettinger Ch., Zimmermann H. W.: *Histochemistry* **95**, 279, (1991).
33. Lalor G. C., Martin S. L.: *Journal of the Society of Dyers and Colourists* **75**, 517, (1959).
34. Zheng Y., Haworth I. S., Zuo Z., Chow M. S. S., Chow A. H. L.: *Journal of Pharmaceutical Sciences* **94**, 1079, (2005).
35. Escandar G. M., Sala L. F.: *Canadian Journal of Chemistry, Revue canadienne de chimie* **69**, 1994, (1991).
36. Jovanovic S. V., Steenken S., Tosic M., Marjanovic B., Simic M. G.: *Journal of the American Chemical Society* **116**, 4846, (1994).
37. Zheng Y., Haworth I. S., Zuo Z., Chow A. H. L.: *Journal of Pharmaceutical Sciences* **94**, 1079, (2005).
38. Dangles O., Dufour C., Bret S.: *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* **2**, 737, (1999).
39. Milane H. A., Ubeaud G., Vandamme T. F., Jung L.: *Biorganic & Medicinal Chemistry* **12**, 3627, (2004).
40. Georgievskii V. P.: *Chemistry of Natural Compounds* **16**, 136, (1980).
41. Brett A. M. O., Ghica M.-E.: *Electroanalysis* **15**, 1745, (2003).
42. Chen H., Zuo Y.: *Food Chemistry* **101**, 1357, (2007).

43. Karapanagiotis I., Lakka A., Valianou L., Chrysoulakis Y.: *Microchimica Acta* **160**, 477, (2008).
44. Krishnamachari V., Levine L. H., Paré P. W.: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 4357, (2002).
45. Galati G., Moridani M. Y., Cham T. S., O'Brien P. J.: *Free Radical Biology & Medicine* **30**, 370, (2001).
46. Gülşen A., Turan B., Makris D. P., Kefalas P.: *European Food Research and Technology* **225**, 435, (2007).
47. Zettersten C., Co M., Wende S., Turner Ch., Nyholm L., Sjöberg P. J. R.: *Analytical Chemistry* **81**, 8968, (2009).
48. Zhou A., Kikandi S., Sadik O. A.: *Electrochemistry Communications* **9**, 2246, (2007).
49. Brett A. M. O., Ghica M.-E.: *Electroanalysis* **15**, 1745, (2003).
50. Papouchado L., Petrie G., Adams R. N.: *Journal of Electroanalytical Chemistry* **38**, 389, (1972).
51. Nilsson A., Ronlan A., Parker V. D.: *Journal of the Chemical Society, Perkin* **1**, 2337, (1973).
52. Sokolová R., Degano I., Hromadová M., Bulíčková J., Gál M., Valášek M.: *Collection of Czechoslovak Chemical Communucations* **75**, 1097, (2010).
53. Ryan M. D., Yueh A., Chen W.-Y.: *Journal of the Electrochemical Society* **127**, 1489, (1980).
54. Makris D. P., Rossiter J. T.: *Journal of Food Composition and Analysis* **15**, 103, (2002).
55. Tournaire C., Hocquaux M., Beck I., Oliveros E., Maurette M.-T.: *Tetrahedron* **50**, 9303, (1994).
56. Jungbluth G., Ruhling I., Temes W. J.: *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* **2**, 1946, (2000).
57. Jorgensen L. V., Comett C., Justesen U., Skibsted L. H., Gragsted L. O.: *Free Radical Research* **29**, 339, (1998).
58. Sokolová R., Degano I., Ramešová Š., Bulíčková J., Hromadová M., Gál M., Fiedler J., Valášek M.: *Electrochimica Acta* 2011, accepted (DOI 10.1016/j.electacta.2011.04.121).
59. Hendrickson H. P., Kaufman A. D., Lunte C. E.: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **12**, 325, (1994).

60. Sýkora V., Zátka V.: Příruční tabulky pro chemiky, 2.doplněné vydání, Státní nakladatelství technické literatury, Praha 1960.
61. Eckschlager K.: Chemometrie, Karolinum, Praha 1991.
62. Zare H. R., Namazian M., Nasirizadeh N.: Journal of Electroanalytical chemistry **584**, 77, (2005).
63. Jacq J.: Journal of Electroanalytical Chemistry **29**, 149, (1971).
64. Abhayawardhana A. D., Sutherland T. C.: Journal of Electroanalytical Chemistry **653**, 50, (2011).
65. Pérez R., Galvín R. M., Mellado J. M. R.: Collection of Czechoslovak Chemical Communications **67**, 429, (2002).
66. Morrow G.W.: Anodic Oxidation of Oxygen - Containing Compounds in Organic Electrochemistry (Lund H. a Hammerich O.-Ed.), 4.vydání, Marcel Dekker Inc., New York 2001.
67. Savéant J.-M.: Elements of Molecular and Biomolecular Electrochemistry, 1.vydání, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2006
68. Dangles O., Fargeix G., Dufour C.: Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions **2**, 1387, (1999).
69. Bartovská L.: Chemická kinetika, 1.vydání, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2008.
70. Vacík J.: Obecná chemie, 1.vydání, Státní pedagogické nakladatelství, Praha 1986.

## 6. Příloha A

### Seznam publikací:

- 1) Zavázalová J., Dejmková H., Ramešová Š., Barek J., Pecková K.: Amperometric and spectrophotometric detection of aminobiphenyls and aminonaphthalenes in HPLC
- 2) Sokolová R., Degano I., Bulíčková J., Ramešová Š., Hromadová M., Gál M., Fiedler J., Valášek M.: The oxidation mechanism of the antioxidant quercetin in nonaqueous media, *Electrochim. Acta* **2011**, accepted, DOI 10.1016/j.electacta.2011.04.121
- 3) Ramešová Š., Sokolová R., Degano I., Žabka J., Bulíčková J., Gál M.: On Stability of Bioactive Flavonoids Quercetin and Luteolin under Aerobic Conditions, *Chemical Communication* **2011**, submitted

**Přednášky prezentované na vědeckých konferencích a seminářích:**

- 1) Sokolová R., **Ramešová Š.**, Pospíšil L., Hromadová M., Degano I.: “The Influence of the Host-Guest Interaction on the Oxidation of Natural Flavonoid Dyes“, *15<sup>th</sup> International Cyclodextrin Symposium*, Sborník P125, Vienna 9.-12.5. 2010
- 2) Sokolová R., **Ramešová Š.**, Degano I., Hromadová M., Pospíšil L., Žabka J.: “On the Difference in Oxidation Mechanism of Flavonoids Related to their Chemical Structure“, *The 61<sup>st</sup> Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, Symposium S09 – Molecular Electrochemistry-Methods, Models, Molecules, Materials*, Abstrakt na CD, s09-P-059, Nice, 26.8.-1.9. 2010
- 3) **Ramešová Š.**, Sokolová R., Pecková K.: “Elektrochemické studium degradace přírodních barviv používaných na uměleckých památkách“, Soutěž o cenu firmy Merk, Chemické listy 105, s62-s64, (2011) Ústí nad Labem, 1.2.2011
- 4) **Ramešová Š.**, Sokolová R.: “Elektrochemické studium degradace přírodních barviv“, Seminář studentů ÚFCH JH, Sborník ISBN 978-80-87351-11-6, Konferenční centrum AV ČR v Liblicích, 11.- 13.4.2011